

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

TESIS DE GRADUACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

“MAGÍSTER EN MANEJO INTEGRAL DE LABORATORIOS DE
DESARROLLO”

TEMA

**“DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE CARBAMATOS
MEDIANTE LC-ESI-MS/MS EN TOMATES RIÑÓN (*Lycopersicum
esculentum*) EXPENDIDOS EN MERCADOS DE GUAYAQUIL.”**

AUTOR:

MICHAEL GUILLERMO RENDÓN MORÁN

Guayaquil – Ecuador

Año

2013

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis amados padres Cecilia y Carlos, a mis queridos hermanos Isabel y Kevin, a mi sobrinita Ivette, a mi amada Lisseth, a mis abuelitos, a mis tíos y a mis amigos más cercanos, que con sus consejos y distintas formas de apoyo fueron los ingredientes que influyeron en mi persona para culminar con éxito este trabajo de investigación.

Michael

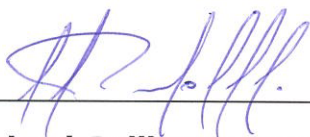
AGRADECIMIENTOS

Expreso mi especial agradecimiento a la Ph.D. Olga Gonzáles, que con su asesoría permanente, me permitió culminar con éxito la presente tesis. A la empresa WSS, en especial al M.Sc. Fernando Gualpa, por facilitarme los equipos para el desarrollo y trabajo de mi tesis. A Lisseth Guerrero por su valiosa ayuda en el trabajo analítico. En general a todos quienes de una forma desinteresada me brindaron todo su apoyo.

Michael

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este tipo de Proyecto de Graduación, me corresponde exclusivamente; el patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales** de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

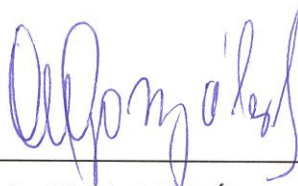


Michael Guillermo Rendón Morán

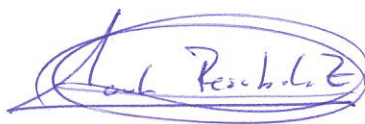
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ph.D. FRANCISCO VERA ALCÍVAR
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ph.D. OLGA GONZÁLES SÁNCHEZ
DIRECTOR DE LA TESIS



M.Sc. CAROLA RESABALA ZAMBRANO
VOCAL DEL TRIBUNAL

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
DECLARACIÓN EXPRESA	iii
FIRMA DEL TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
ABREVIATURAS	xii
OBJETIVOS GENERALES	xiv
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xiv
INTRODUCCIÓN	xv
	Pág.
CAPÍTULO I	
Información General	1
1.1 Tomate riñón	1
1.1.1 Antecedentes	1
1.1.2 Propiedades del tomate riñón	3
1.2 Carbamatos	5
1.2.1 Aspectos generales	5
1.2.2 Carbamatos en estudio	6
1.2.3 Propiedades fisicoquímicas	6
1.2.4 Propiedades toxicológicas	8
1.2.5 Legislación internacional	9
1.3 Técnicas analíticas de detección de Carbamatos	12
1.3.1 Cromatografía	12
1.3.2 UPLC	14
1.3.3 Espectrometría de masas	15
1.3.4 Adquisición de datos	20
1.4 Validación de métodos analíticos	24
1.4.1 Especificidad	24
1.4.2 Linealidad de la curva de calibración	25
1.4.3 Límite de cuantificación	25
1.4.4 Límite de detección	25
1.4.5 Precisión	25
1.4.6 Veracidad	26
1.4.7 Incertidumbre en la medición	27
CAPÍTULO II.	
Materiales y Métodos.	29
2.1 Reactivos	29
2.2 Equipos	30
2.3 Metodología	31
2.3.1 Establecimiento de condiciones cromatográficas	31
2.3.2 Establecimiento de condiciones espectrométricas	32

2.3.3 Preparación de las soluciones estándar	33
2.3.4 Preparación de las muestras	33
2.3.5 Procesamiento y adquisición de datos	34
CAPÍTULO III.	
Diseño Experimental	35
3.1 Selección del área de estudio	35
3.2 Muestreo	37
3.3 Programa y objetivos de validación	37
3.4 Análisis estadísticos de datos de validación	38
CAPÍTULO IV.	
Resultados y Discusión	40
4.1 Método desarrollado	40
4.1.1 Condiciones cromatográficas	40
4.1.2 Condiciones espectrométricas para la de detección de carbamatos	45
4.2 Validación del método	52
4.2.1 Selectividad	52
4.2.2 Curva de calibración	53
4.2.3 Límite de Detección	59
4.2.4 Límite de Cuantificación	59
4.2.5 Precisión	60
4.2.6 Recuperación	63
4.2.7 Incertidumbre en la medida	64
4.3 Resultados de los tomates muestreados	66
4.4 Límites máximos residuales de carbamatos en tomates riñón	69
4.5 Ingesta Diaria Admisible IDA	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Estructura básica del ácido carbámico
Fig. 2	Esquema básico de un cromatógrafo de líquidos
Fig. 3	Componentes básicos de un espectrómetro de masas
Fig. 4	Esquema de un LC-MSMS con ionización ESI
Fig. 5	Esquema de la fuente de ionización ESI
Fig. 6	Esquema de un cuadrupolo con combinación de voltajes alternos y continuos
Fig. 7	Trayectoria de iones a través del cuadrupolo
Fig. 8	Esquema de un fotomultiplicador
Fig. 9	Espectro de masas de la familia del Ibuprofeno
Fig. 10	Modo SIR. Cromatograma de tiometoxano y su metabolito
Fig. 11	Scan de iones hijos o iones productos.
Fig. 12	Modo MRM. Diferencia entre SIR y MRM
Fig. 13	Módulo de separación Acquity BSM acoplado a un espectrómetro de masas XEVO TQMS con ionización por electrospray
Fig. 14	Puntos de muestreo
Fig. 15	Cromatograma superpuesto de los 14 carbamatos monitoreados
Fig. 16	Cromatograma individual de cada carbamato
Fig. 17	Parámetros de la fuente de ionización señalados en el programa MS TUNE.
Fig. 18	MRM de tres canales para el Methomyl
Fig. 19	S/N del EPTCarbamato y del Propamocarb
Fig. 20	Efecto Matriz
Fig. 21	Selectividad
Fig. 22	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Aldicarb.
Fig. 23	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbaryl.
Fig. 24	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbofuran.
Fig. 25	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbofuran.
Fig. 26	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el EPTC.
Fig. 27	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Fenoxicarb.
Fig. 28	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Indoxacarb.
Fig. 29	Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Methiocarb.

- Fig. 30** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Methomyl.
- Fig. 31** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Oxamyl.
- Fig. 32** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Pirimicarb.
- Fig. 33** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propamocarb.
- Fig. 34** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propyzamide.
- Fig. 35** Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propoxur.
- Fig. A-1** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Methomyl a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-2** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Propamocarb a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-3** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con EPTC a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-4** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Carbendazim a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-5** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Carbaryl a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-6** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Propoxur a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-7** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Aldicarb a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-8** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Carbofuran a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-9** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Methiocarb a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-10** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Oxamyl a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-11** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Pirimicarb a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-12** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Propyzamide a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-13** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Fenoxycarb a 10 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$
- Fig. A-14** Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con Indoxacarb a 5 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Datos de producción de tomate riñón sembrado y cosechado a nivel nacional por años
Tabla II	Composición proximal y Vitamina C en 100 g tomate fresco
Tabla III	Análisis de macroelementos y microelementos en tomate fresco
Tabla IV	Contenido de Carotenoides $\mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ peso seco
Tabla V	Nombre, estructura, Peso molecular y fórmula empírica de los carbamatos en estudio.
Tabla VI	Propiedades físicas y de degradación medioambiental de los carbamatos en estudio.
Tabla VII	DL50 y clasificación toxicológica de los carbamatos en estudio
Tabla VIII	Límites máximos residuales (LMR) para el tomate riñón
Tabla IX	Ingesta diaria admisible para carbamatos en estudio
Tabla X	Tipos, características y limitaciones de las configuraciones más utilizadas en espectrometría de masas
Tabla XI	Preparación de la curva de calibrado
Tabla XII	Programa de Validación de Residuos de carbamatos en muestras de tomate riñón
Tabla XIII	Objetivos de validación
Tabla XIV	Gradiente cromatográfico desarrollado para la determinación de carbamatos
Tabla XV	Tiempo de retención (min.) de los carbamatos en estudio
Tabla XVI	Condiciones espectrométricas para determinar carbamatos por ESI LC-MS/MS.
Tabla XVII	Parámetros de MRM para análisis de carbamatos por MS/MS tomadas de la base de datos QUAMPEDIA
Tabla XVIII	Peso molecular e Ion precursor $[\text{MH}]^+$ de los carbamatos en estudio
Tabla XIX	Transiciones de cuantificación y cualificación de los carbamatos en estudio
Tabla XX	Señal ruido S/N de los carbamatos a $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Tabla XXI	Parámetros considerados para el método de procesamiento de los carbamatos
Tabla XXII	Parámetros de curva de calibración
Tabla XXIII	Límite de Detección LOD de los carbamatos en estudio
Tabla XXIV	Precisión y recuperación al nivel del Límite de cuantificación
Tabla XXV	Precisión en términos de RSD_r y RSD_R obtenidos durante la validación.
Tabla XXVI	Porcentajes de recuperación obtenidos en la validación
Tabla XXVII	Fuentes de incertidumbre y su contribución a la incertidumbre total del método
Tabla XXVIII	Resultados de Carbamatos que dieron resultados positivos en

	los puntos de muestreo
Tabla XXIX	Porcentaje de muestras detectadas y cantidad de valores por encima de los LMR establecidos
Tabla XXX	Promedios de valores de carbamatos en Mercados y Supermercados de Guayaquil
Tabla XXXI	Carbamatos que se encuentran por encima de los LMR establecidos
Tabla XXXII	Ingesta diaria de carbamatos en la dieta ecuatoriana por consumo de tomate riñón.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Producción (TM) por años de tomate riñón en Ecuador
Gráfico 2	Gradiente cromatográfico
Gráfico 3	Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 5 ug.kg ⁻¹
Gráfico 4	Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 10 ug.kg ⁻¹
Gráfico 5	Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 15 ug.kg ⁻¹
Gráfico 6	Porcentajes de recuperación por niveles de fortificación
Gráfico 7	Contribuciones a la Incertidumbre total del método.
Gráfico 8	Comparación de los niveles de carbamatos detectados en Mercados y Supermercados de Guayaquil.
Gráfico B-1	Curvas de calibrado methomyl
Gráfico B-2	Curvas de calibrado propamocarb
Gráfico B-3	Curvas de calibrado EPTC
Gráfico B-4	Curvas de calibrado carbendazim
Gráfico B-5	Curvas de calibrado carbaryl
Gráfico B-6	Curvas de calibrado propoxur
Gráfico B-7	Curvas de calibrado aldicarb
Gráfico B-8	Curvas de calibrado carbofuran
Gráfico B-9	Curvas de calibrado methiocarb
Gráfico B-10	Curvas de calibrado oxamyl
Gráfico B-11	Curvas de calibrado pirimicarb
Gráfico B-12	Curvas de calibrado propyzamide
Gráfico B-13	Curvas de calibrado fenoxycarb
Gráfico B-14	Curvas de calibrado indoxacarb

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
AOAC	Asociación oficial de químicos analíticos
BEH C18	Columna octadecyl silano con puente híbrido de etileno
BSM	Administrador con sistema binario o bomba binaria
BIPM	International Bureau of Weights and Measures
C18	Columna de octadecyl silano
Ca	Calcio
MRC	Material de referencia certificado
Cu	Cobre
CV	Coeficiente de variación
DC	Voltaje continuo
DL50	Dosis letal 50
DT50	Tiempo de disipación (días) del 50 % del producto
EC	Comunidad Europea
EPTC	S-Etil dipropiltiocarbamato
ESI	Ionización por electro spray
FAO	Organización mundial para la agricultura y alimentación
FAOSTAT	División estadística de la FAO
FDA	Administración de los Estados Unidos para alimentos y fármacos
Fe	Hierro
GC	Cromatografía de gases
GUM	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement
Ha.	Hectárea
HM	Masa alta
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
IDA	Ingesta diaria admisible
K	Potasio
L.H ⁻¹	Litros por Hora
LC	Cromatografía Líquida
LCMSMS	Cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas tándem
LM	Masa baja
LMR	Límite máximo residual
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m/z	Relación masa carga

MAGAP	Ministerio de Agricultura ganadería y pesca
Mg	Magnesio
mL min ⁻¹	Mililitro por minuto
Mn	Manganeso
MRM	Monitoreo por reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS1 o Q1	Cuadrapolo 1
MS2 o Q2	Cuadrapolo 2
MSMS	Espectrometría de masas tándem
Na	Sodio
NAD-asa	Enzima de la Nicotinamida adenina dinucleótido
P	Fósforo
pH	Potencial de hidrógeno
PSA	Amina primaria secundaria
Quechers	Siglas en inglés de Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro.
r.p.m.	Revoluciones por minuto
r	Coeficiente de correlación
r ²	Coeficiente de determinación
RF	Voltaje alterno
RSD r	Desviación estándar relativa por repetitividad
RSD R	Desviación estándar relativa por reproducibilidad
S	Azufre
S/N	Relación señal ruido
Se	Selenio
SIGAGRO	Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria
SIR	Registro del ion seleccionado
Tm.	Tonelada métrica
UPLC	Cromatografía líquida de ultra performance
USEPA	Agencia protectora del medioambiente de los EEUU
V	Voltio
WHO	Organización mundial de la Salud
Zn	Zinc

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar los niveles de residuos de carbamatos presentes en muestras de tomate riñón (*Lycopersicum esculentum*), comercializados en mercados de Guayaquil, mediante Cromatografía líquida y espectrometría de masas tandem LC-MS/MS con el fin de determinar su concentración en el expendio del producto y la valoración del efecto sobre la salud humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollar un método de análisis rápido, preciso y exacto por LC-MS/MS para residuos de carbamatos en matriz de tomate riñón.
- Validar el método de análisis de acuerdo a las directrices de la norma europea Comisión Decisión 2002/657/EC para residuos de plaguicidas.
- Cuantificar el contenido de residuos de carbamatos en tomates riñón muestreados en 6 mercados y 4 supermercados de Guayaquil.
- Conocer si existen Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en la producción de tomates riñón a partir de la relación entre los datos obtenidos en los ensayos de residuos de carbamatos y los Límites Máximos Residuales (LMR) propuestos por la Unión Europea y del Codex Alimentarius.
- Conocer el riesgo toxicológico a partir de la relación entre los datos obtenidos en los ensayos de residuos de carbamatos y la Ingesta Diaria Admisible (IDA) propuesta por el Codex Alimentarius y la Unión europea para los compuestos en estudio.

INTRODUCCIÓN

Si bien existe una cultura del Estado Ecuatoriano en aseguramiento de la calidad de los alimentos, esta solo se limita al control de productos alimenticios elaborados, donde los ensayos de inocuidad están orientados a encontrar contaminación a nivel microbiológico. Sin embargo hoy en día debido al uso necesario de ciertos plaguicidas, antibióticos y factores de crecimiento para la producción agrícola, ganadera, aviar y de pesca; se hace indispensable el control de estas sustancias y sus residuos en todos los alimentos con el fin de asegurar que no existan niveles que podrían poner en riesgo la salud de la población ecuatoriana.

Existe en el país tanto en empresa privada como pública equipos instrumentales con tecnología de última generación diseñadas exclusivamente para la determinación y cuantificación de estos químicos de uso controlado, pero gran parte de laboratorios dedicados a la realización de estos ensayos cuentan con metodologías sin validar y las pocas que son validadas son de uso exclusivo para productos alimenticios de exportación.

El presente trabajo plantea el desarrollo y validación de una técnica rápida, sencilla y con la utilización de equipos de alta tecnología para la determinación de residuos de carbamatos en un alimento vegetal ampliamente consumido por los ecuatorianos, como es el caso del tomate riñón.

El tomate riñón presenta una serie de bondades nutricionales, su alto contenido de antioxidantes, principalmente el licopeno se lo ha relacionado como una protección natural a la formación de ciertos cánceres por la disminución de radicales libres en el cuerpo y a su contenido nada despreciable de carotenos, tocoferoles y vitamina C relacionados con el buen desempeño del organismo humano.

Los datos obtenidos mostrarían de una manera más objetiva qué carbamatos son utilizados en el cultivo del tomate, los niveles presentes, el aporte a la dieta ecuatoriana, y si estos niveles representarían un posible riesgo a la salud de los guayaquileños.

Metodología

En la presente tesis se analizarán 14 Carbamatos utilizados comúnmente como plaguicidas para los cultivos de hortalizas, entre los cuales tenemos: Aldicarb, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, EPTCarbamato, Fenoxycarb, Indoxacarb, Methiocarb, Methomyl, Oxamyl, Pirimicarb, Propyzamide, Propamocarb y Propoxur.

Como se mencionó párrafos arriba la matriz ensayada será el tomate riñón, *Lycopersicum esculentum*.

Los pesos y cantidades de reactivos necesarios para la optimización del análisis, así como los criterios instrumentales se afinarán en el respectivo desarrollo del método de análisis. Una vez afinado el método se procederá a validarlo bajo parámetros de calidad establecidos en la norma europea Comisión de Decisión 2002/657/EC [1] para demostrar que el método propuesto cumple su fin analítico.

Las muestras serán recolectadas en diez centros de expendio masivos de Guayaquil. Se tomará una muestra para laboratorio en cada punto de expendio según la Directiva 2002/63/EC para muestreo y análisis de plaguicidas en alimentos de consumo humano [2] y se hará un monitoreo cada semana por tres ocasiones más.

El método de extracción para carbamatos en la matriz seleccionada será por Quechers (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe) que utiliza como extractante al acetonitrilo acidificado al 1% con ácido acético y para la limpieza se utilizará sales anhidras con un sorbente dC18 y amina primaria secundaria para retener agua, material grasoso y sustancias polares respectivamente [3]. Para la cuantificación se utilizará un Cromatógrafo de Líquidos con fuente de ionización ESI positivo acoplado a un Espectrómetro de Masas Tandem permitiéndonos detectar niveles trazas de los analitos estudiados.

Una vez concluidos los ensayos de validación y obtenido los respectivos datos, estos serán analizados mediante técnicas estadísticas para demostrar que el método empleado cumple su fin analítico. En cuanto a los resultados de los ensayos realizados a las muestras recolectadas en los puntos de expendio se les procederá a comprobar si existen valores que sobrepasan los LMR permitidos y si su aporte a la IDA (ingesta diaria admisible) se lo podría

considerar como un impacto negativo a la salud de los consumidores guayaquileños.

Este método de determinación servirá de base para la realización de análisis en futuras matrices alimenticias, como: choclo, maíz, pimiento, cebolla, lechuga, papa, pepinos, brócoli y demás productos que formen parte principal de la canasta básica de los ecuatorianos.

La transferencia de la información del método desarrollado y utilizado en el presente estudio se dará a través de la ESPOL y podrá ser implementada en cualquier laboratorio que cuente con los equipos necesarios para su realización, tanto en centros de investigación como en laboratorios privados.

CAPÍTULO I

1. INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Tomate riñón

1.1.1. Antecedentes

El tomate riñón es una de las hortalizas de mayor consumo a nivel mundial, de acuerdo a datos mostrados por la FAO en el 2011 se llegó a una producción total en el mundo de 159.0 millones de toneladas métricas TM, siendo China el país con mayor producción de tomate, alcanzando una producción de 48.5 millones de TM para el mismo año [4].

En el Ecuador la producción no ha ido creciendo en el transcurso de los años. Cada año son menos hectáreas cultivadas, sin embargo mantiene una importante producción que según datos mostrados por el MAGAP para el año 2010, hubo una producción cercana a las 53 mil TM en fruta fresca [5], ver Tabla I. En el gráfico 1 se puede observar la tendencia en la producción del tomate riñón en el Ecuador del año 2000 al 2010.

Otro dato estadístico presentado por la FAO es el consumo per cápita de tomate fresco en Ecuador, que al año 2009 fue establecido en 3.9 kg/año/persona y 11 g/día/persona [6].

Tabla I. Datos de producción de tomate riñón sembrado y cosechado a nivel nacional por años

Año	Superficie sembrada (Ha.)	Superficie cosechada (Ha.)	Producción en fruta fresca (Tm.)^a	Rendimiento (Tm./Ha.)
2000	3333	2989	61425	20.55
2001	3530	3251	63149	19.43
2002	3035	2909	58646	20.16
2003	2769	2600	45056	17.33
2004	3392	3242	84886	26.18
2005	3443	3310	72160	21.80
2006	3431	3092	61987	20.05
2007	2971	2652	70094	26.43
2008	2609	2568	50552	19.69
2009	2317	2259	46537	20.60
2010	2033	2037	53518	26.27

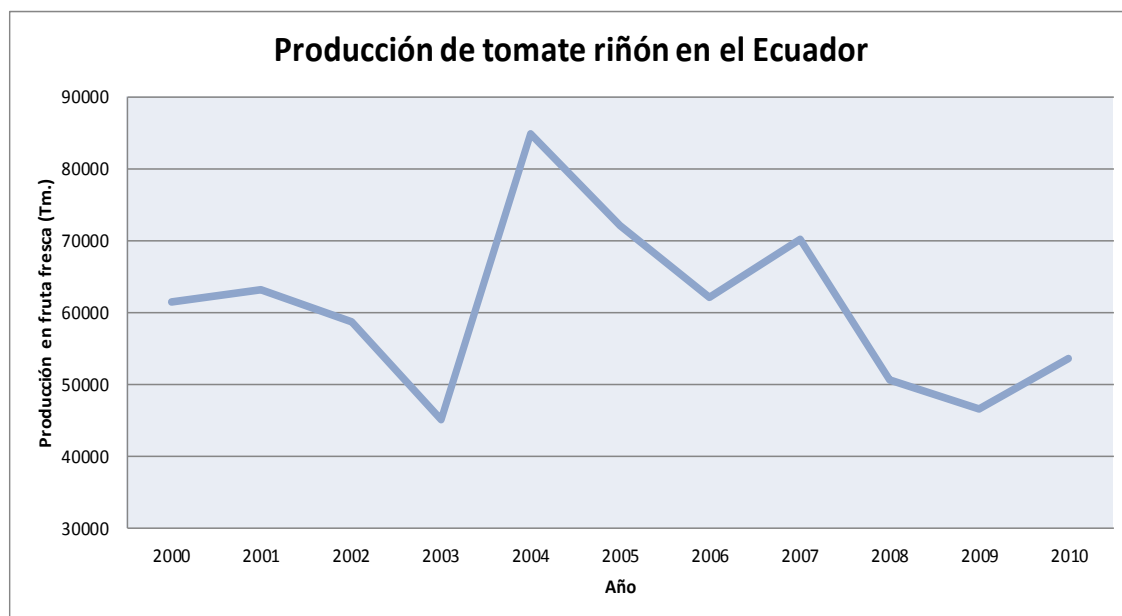
^a El Total Nacional no necesariamente será igual a la sumatoria de los datos provinciales, ya que en la mayoría de los casos se presentan cifras parciales, o están ocultas debido a razones de confiabilidad y confidencialidad estadística.

Fuente: MAGAP- SIGAGRO

Elaboración: Esquema del autor

Las principales zonas con mayor cultivo de tomate riñón en el Ecuador se encuentran ubicadas en las zonas de Pimampiro, Patate, Pelileo, Catamayo, Guayas y Portoviejo.

Gráfico 1. Producción (Tm.) por año de tomate riñón en el Ecuador



Fuente: MAGAP-SIGAGRO

1.1.2. Propiedades del tomate riñón

El tomate riñón es la principal hortaliza que forma parte en la dieta a nivel mundial. Muchos estudios han establecido una relación entre la ingesta dietética de los tomates, y un riesgo reducido de cáncer y enfermedades cardiovasculares [7]. Gran parte de sus excelentes beneficios se debe a un pigmento conocido como licopeno, el cual posee gran actividad antioxidante.

Se ha demostrado que el licopeno no sólo tiene fuerte actividad antioxidante, sino que también induce la comunicación de célula a célula; modula las hormonas, el sistema inmunológico, y otras vías metabólicas [8]. Estudios demostraron que un consumo diario de 15 mg de licopeno reduce la proteína C reactiva reportada como un principal marcador en procesos inflamatorios y un vaticinador de enfermedades cardiovasculares [9].

Además del licopeno existen otros carotenoides presentes en el tomate, tales como la violaxantina, neoxanthin, luteína, zeaxantina, a-criptoxantina, b-criptoxantina, a-caroteno, b-caroteno, g-caroteno, z-caroteno, neurosporeno, fitoeno, fitoflueno, cyclolycopene y b-caroteno 5,6-epóxido [10, 11, 12 y 13]. Entre éstos, el caroteno, b-caroteno y b-cryptoxanthin tienen actividad pro-vitamina A, puesto que son convertidos a retinol por los mamíferos [12].

Los frutos de *Lycopersicum esculentum* deben su color rojo intenso a la presencia de estos pigmentos carotenoides que se sintetizan de forma masiva durante la maduración de la fruta.

Otros componentes nutricionales considerados valiosos y que se encuentran presentes en los tomates son varios minerales, el ácido ascórbico o conocido comúnmente como la vitamina C [14], tocoferoles y compuestos fenólicos tales como el ácido clorogénico, ácido cafeico y la rutina [15]. Estos nutrientes pueden variar en gran medida dependiendo de las condiciones de cultivo. De hecho, se ha establecido que los tomates cultivados en sustratos orgánicos contienen significativamente más Ca y Vitamina C, y menos Fe que las cultivadas en medios hidropónicos. Por el contrario, el contenido de K y P no difirieron en frutas cultivadas tanto en sustratos orgánicos como en hidropónicos [16].

En la tabla II, III y IV se presenta una la composición proximal del tomate variedad Daniela, así como sus macro y micronutrientes y carotenoides analizados [17].

Tabla II. Composición proximal y Vitamina C en 100 g tomate fresco [17]

	Humedad (g)	Proteína cruda (g)	Carbohidratos disponibles (g)	Grasa (g)	Cenizas (g)	Vitamina C (mg)
Tomate variedad Daniela	96.0 ± 1.0*	0.8 ± 0.02	1.26 ± 0.32	0.28 ± 0.06	0.75 ± 0.14	62 ± 12

*Cada resultado es expresado como el promedio ± DS de el análisis de cinco diferentes tomates

Los compuestos fenólicos exhiben una amplia gama de propiedades fisiológicas, tales como antialérgico, antiaterogénico, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidante, antitrombótico, efectos cardioprotectores, y vasodilatador [18]. Mientras que el ácido ascórbico y tocoferol se reconocen como vitaminas antioxidantes y compuestos termolábiles. Los compuestos fenólicos y el licopeno son más resistentes a procesos térmicos, siendo los principales antioxidantes en los productos transformados.

Tabla III. Análisis de macroelementos y microelementos en tomate fresco [17]

	Macroelementos mg.100g ⁻¹ peso fresco						Microelementos ug.100g ⁻¹ peso fresco				
	Na	K	Ca	Mg	P	S	Mn	Fe	Cu	Zn	Se
Tomate variedad Daniela	7.3 ± 0.3	290 ± 12	13.1 ± 1.5	14.1 ± 0.9	9.9 ± 3.6	16.7 ± 0.6	135 ± 12	2092 ± 23	45 ± 8	1730 ± 62	1.03 ± 0.1

*Cada resultado es expresado como el promedio ± DS de el análisis de cinco diferentes tomates

Las interacciones sinérgicas entre estos diversos fitonutrientes en los tomates son responsables de su beneficioso efecto sobre la salud. En este sentido, al tomate riñón se le ha sido conferido el estado de un "alimento funcional" o "nutracéutico" [19].

Tabla IV. Contenido de Carotenoides ug.100g⁻¹ peso seco [17]

	All trans Luteína	B caroteno	9 Cis B caroteno	Licopeno	Isómero de Licopenos	Neurospeno	Total carotenoides
Tomate variedad Daniela	7 ± 2	20 ± 4	3 ± 2	129 ± 11	-	102 ± 11	261 ± 28

*Cada resultado es expresado como el promedio ± DS de el análisis de cinco diferentes tomates

1.2. Carbamatos

1.2.1. Aspectos generales

Los plaguicidas son de vital importancia ya que se utilizan ampliamente para el control de plagas en la agricultura, la jardinería, hogares y tratamiento de suelos [20, 21].

Los carbamatos son uno grupo principal de plaguicidas orgánicos sintéticos, desde su introducción en el mercado de agroquímicos a partir de 1950 [22] y utilizándose cada año a gran escala en todo el mundo [23].

Los carbamatos son ésteres del ácido carbámico con sustitución tanto en el grupo amino como carboxilato ($R^1-NH-CO-OR^2$) [24]. Las propiedades químicas dependerán del grupo químico que sea sustituido tanto en el extremo amino, como en el carboxilato, tal como lo muestra la figura 1. Los sustituyentes comunes en extremo amino son el metilo y etilo, mientras que en el extremo del carboxilato son sustituidos comúnmente por compuestos alcohol arilos, alifáticos y aromáticos.

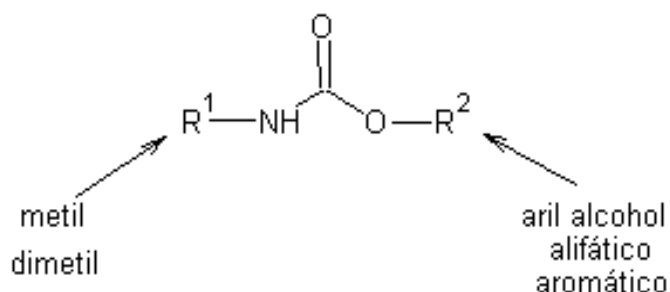


Figura 1. Estructura básica del ácido carbámico y lugares de sustitución para formar carbamatos. Esquema del autor.

El mecanismo de envenenamiento por carbamatos en insectos comprende la inactivación reversible del sitio activo de la acetilcolinesterasa, enzima esencial que tiene un papel importante en el sistema nervioso de los seres humanos, y otras especies de animales [25], por este motivo los carbamatos son a menudo llamados anticolinesterásicos.

La acumulación de acetilcolina produce signos de envenenamiento agudo, los cuales son resultados principalmente de efectos muscarínicos de la acetilcolina

en los órganos efectores autónomos (miosis, lagrimeo, vómitos, diarrea, salivación, micción frecuente, disnea, bradicardia e hipotensión) y efectos nicotínicos en la unión neuromuscular (espasmos musculares seguidos de debilidad y parálisis) [26].

Otras alteraciones que provocan a distintos niveles son: disminución de la actividad tiroidea, del metabolismo hepático, y de la síntesis de fosfolípidos en el cerebro, aumento de la actividad NAD-hidroxilasa, alteración de los niveles de serotonina plasmática e hiperglicemia [27].

Existe un limitado número de carbamatos que no inhiben la acetilcolinesterasa, sino que tienen un efecto inhibitor en la división celular [22], estos carbamatos son utilizados como herbicidas.

1.2.2. Carbamatos en estudio

En el presente trabajo se analizarán un total de 14 carbamatos, 11 metilcarbamatos y tres compuestos derivados de carbamatos (EPTC, carbendazim y propyzamide). Este grupo de pesticidas son usados comúnmente para fines de control agrícola frente a plagas. Los nombres, estructuras y pesos moleculares de los carbamatos en estudio se encuentran detallados en la tabla V.

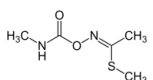
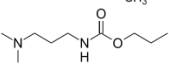
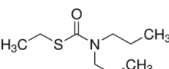
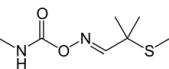
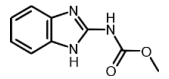
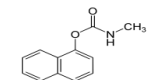
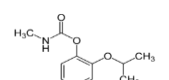
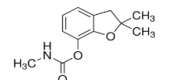
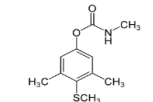
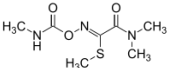
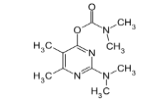
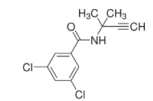
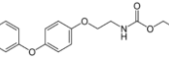
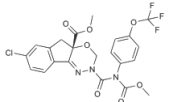
1.2.3. Propiedades físicoquímicas

Los carbamatos son solubles en solventes orgánicos y ligeramente solubles en agua como el aldicarb, methomyl, oxamyl, pirimicarb, propamocarb y propoxur. Sus puntos de fusión van de 53.6 °C en el fenoxycarb hasta los 156 °C en la propyzamide [28].

La mayoría son compuestos pocos volátiles, a excepción del EPTC que sí es volátil. Gran parte de los carbamatos no persisten mucho tiempo en el suelo, a excepción de la carbendazim y el pirimicarb que son moderadamente persistentes en el suelo. La estabilidad en el medio ambiente se ve afectada severamente por fotodegradación y oxidación por exposición al aire, estos aspectos de descomposición han sido discutidos por Kuhr and Dorough [29]. La carbendazim, el methomyl y el propamocarb son estables a la fotólisis acuosa a

un pH establecido de 7. En tanto que el fenoxycarb, pirimicarb, methomyl, propamocarb y propyzamide son estables a la hidrólisis acuosa a pH 7 y 20 °C.

Tabla V. Nombre, estructura, Peso molecular y formula empírica de los 14 carbamatos en estudio.

Carbamato	Estructura	Peso Molecular	Fórmula Empírica
METHOMYL		162.21	$C_5H_{10}N_2O_2S$
PROPAMOCARB		188.27	$C_9H_{20}N_2O_2$
EPTCarbamato		189.32	$C_9H_{19}NOS$
ALDICARB		190.26	$C_7H_{14}N_2O_2S$
CARBENDAZIM		191.19	$C_9H_9N_3O_2$
CARBARYL		201.22	$C_{12}H_{11}NO_2$
PROPOXUR		209.24	$C_{11}H_{15}NO_3$
CARBOFURAN		221.25	$C_{12}H_{15}NO_3$
METHIOCARB		225.31	$C_{11}H_{15}NO_2S$
OXAMYL		219.26	$C_7H_{13}N_3O_3S$
PIRIMICARB		238.29	$C_{11}H_{18}N_4O_2$
PROPYZAMIDE		256.13	$C_{12}H_{11}Cl_2NO$
FENOXYCARB		301.34	$C_{17}H_{19}NO_4$
INDOXACARB		527.83	$C_{22}H_{17}ClF_3N_3O_7$

En la Tabla VI se detallan los valores de las propiedades físicas más relevantes, así como su comportamiento frente a condiciones ambientales de degradación.

Tabla VI. Propiedades físicas y de degradación medioambiental de los Carbamatos en estudio.

Carbamatos	Solubilidad en agua a 20° C (mg L ⁻¹) ^a	Punto de fusión °C	Punto de ebullición °C	Presión de vapor a 25 °C (mPa) ^b	Degradación del suelo DT50 (Típico) ^c	Fotólisis acuosa DT50 ^d (días) a pH 7	Hidrólisis acuosa DT50 (días) ^e a 20 °C y pH 7	Referencia
ALDICARB	4930	99	Se descompone antes de ebullición	3.87	10	8	189	[30]
CARBARYL	9.1	138	210	0.0416	16	10	12	[31]
CARBENDAZIM	8	305	Se descompone antes de ebullición	0.09	40	Estable	350	[32]
CARBOFURAN	322	153.1	254	0.08	28	71	37	[33]
EPT CARBAMATO	370	No aplica	127	4500	6	-	300	[34]
FENOXYCARB	7.9	53.6	100,4	8.67 x 10 ⁻⁴	1.55	16,1	Estable	[35]
INDOXACARB	0.2	88.1	-	2.5 x 10 ⁻⁸	19.5	3	22	[36]
METHOMYL	55000	79.6	Se descompone antes de ebullición	0.72	7	Estable	Estable	[37]
METHIOCARB	27	118.5	311	0.015	1.4	11	24	[38]
OXAMYL	148100	99.3	-	0.051	7	7.4	8	[39]
PIRIMICARB	3100	91.6	-	0.43	86	6	Estable	[40]
PROPAMOCARB	1005000	64.2	-	0.87	39.3	Estable	Estable	[41]
PROPOXUR	1800	90	-	1.3	79	0.01	180	[42]
PROPYZAMIDE	9	156	Se descompone antes de ebullición	0.0267	47	41	Estable	[43]

^a ≤ 50: Bajo; 50 - 500: Moderado; > 500: Alto

^b < 1 = No volátil; 1 - 10000 = Estado intermedio; > 10000 = Volátil

^c < 30 = No persistente; 30 - 100 = Moderadamente persistente; 100 - 365 = Persistente; > 365 = Muy persistente

^d < 1 = Rápida; 1 - 14 = Moderadamente rápida; 14 - 30 = Baja; > 30 = Estable

^e < 30 = No persistente; 30 - 100 = Moderadamente persistente; 100 - 365 = Persistente; > 365 = Muy persistente

1.2.4. Propiedades toxicológicas

Los carbamatos se pueden clasificar de acuerdo al tipo de pesticidas que son, entre los cuales tenemos: insecticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas. La carbendazim y el propamocarb son fungicidas; el EPTC y propyzamide son herbicidas, mientras que el resto son insecticidas, acaricidas y nematocidas.

De acuerdo a su dosis letal 50 (DL50) se pueden clasificar a los carbamatos en tres grupos: los que tienen una alta toxicidad, como el aldicarb, oxamyl, carbofuran, methiocarb, methomyl y propoxur; los que tienen una moderada toxicidad como el carbaryl, EPTC, indoxacarb, pirimicarb; y los que tienen una baja toxicidad como la carbendazim, fenoxycarb, propamocarb y propyzamide. El carbaryl, fenoxycarb y propyzamide presentan una limitada evidencia de riesgo cancerígeno [31, 36, 43].

La carbendazim puede causar alteraciones genéticas hereditarias de acuerdo a la Clasificación de riesgo de la Comunidad europea [32].

Una información detallada de los niveles de LD50 y clasificaciones de toxicidad de acuerdo a US EPA y WHO son presentados en la Tabla VII.

Tabla VII. DL50 y clasificación toxicológica de los Carbamatos en estudio

Carbamatos	DL50 oral ratas (mg.kg ⁻¹) ^a	WHO Clasificación ^b	Tipo de Pesticida	US EPA Clasificación ^c	Aspectos generales de la salud humana	Referencia
ALDICARB	0.93	Ia	Insecticida, nematocida, acaricida	I	Altamente tóxico	[30]
CARBARYL	614	II	Insecticida	-	Altamente tóxico, puede ser fatal si se inhala, ingiere o absorbe a través de la piel	[31]
CARBENDAZIM	> 10000	U	Fungicida	III	Evidencia inducción sobre enzimas hepáticas	[32]
CARBOFURAN	7	Ib	Insecticida, Nematocida, Acaricida	I, II	Puede causar la degeneración testicular, Puede ser fatal si se ingiere, inhala o absorbe por la piel	[33]
EPT CARBAMATO	916	II	Herbicida	III	No existe información disponible	[34]
FENOXYCARB	> 10000	U	Insecticida	III	Posible tóxico en hígado, tiroides y riñón	[35]
INDOXACARB	268		Insecticida	III	No existe información disponible	[36]
METHOMYL	30	Ib	Insecticida, acaricida	I, II, III*	No existe información disponible	[37]
METHIOCARB	19	Ib	Insecticida, molusquicida, repelente de aves	I	No existe información disponible	[38]
OXAMYL	2.5	Ib	Insecticida, Nematocida, Acaricida	I, II	Peligroso si es ingerido	[39]
PIRIMICARB	142	II	Insecticida	II	Altamente tóxico, puede ser fatal si se inhala, ingiere o absorbe a través de la piel	[40]
PROPAMOCARB	> 1330	U	Fungicida	IV	Sensibilizador de piel	[41]
PROPOXUR	50	II	Insecticida, acaricida	II	Tóxico	[42]
PROPYZAMIDE	> 2500	U	Herbicida	IV	No existe información disponible	[43]

^a > 2000 = Baja; 100-2000 = Moderado; < 100 = Alta.

^b Clase Ia: Extremadamente peligroso; Clase Ib: Altamente peligroso; Clase II: moderadamente peligroso; Clase III: Ligeramente peligroso; U: Improbable que presenten un riesgo grave

^c I: Altamente tóxico; II: Moderadamente tóxico; III: Ligeramente tóxico; IV: No tóxico

* I (oral, ojos), II (inhalación), III (dérmico)

1.2.5. Legislación Internacional

La aplicación y uso de plaguicidas en la agricultura no está exenta de riesgos para la salud humana, estudios demuestran que la principal vía de exposición de pesticidas a humanos es por medio de los alimentos, de 10³ a 10⁵ más que el inducido por inhalación o por el agua de consumo [44].

Toda legislación relacionada con el uso de plaguicidas se centra en la Seguridad Alimentaria y en el establecimiento y control de los llamados límites máximos residuales LMR. Se conoce como LMR el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos, expresado en mg.kg⁻¹, establecido de conformidad con reglamentos internacionales Regulación (EC) No 396/2005 [45] o Codex Alimentarius [46], estos LMR están basado en las buenas prácticas agrícolas BPA y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores vulnerables.

Tabla VIII. Límites máximos residuales (LMR) para el tomate riñón

<i>Carbamatos</i>	<i>LMR EU (mg.kg⁻¹)</i>	<i>LMR CODEX (mg.kg⁻¹)</i>
ALDICARB	0.02	- ^a
CARBARYL	0.5	5
CARBENDAZIM	0.3	0.5
CARBOFURAN	0.02	-
EPT CARBAMATO	0.01	-
FENOXYCARB	0.05	-
INDOXACARB	0.05	0.5
METHOMYL	0.02	1
METHIOCARB	0.2	-
OXAMYL	0.2	2
PROPAMOCARB	10	2
PROPOXUR	0.05	-
PIRIMICARB	1	-
PROPYZAMIDE	0.02	-

^a No se han establecido LMR para estos carbamatos en tomates

Fuente [45, 46]

Existen LMR para cada tipo de alimento, sea primario o procesado, de origen vegetal o animal, en la tabla VIII se muestra los LMR de los carbamatos analizados en el presente estudio establecidos para el tomate riñón, tanto por la Comunidad Europea como por el Codex Alimentarius. En el Ecuador no existe una legislación nacional vigente sobre límites máximos de residuos de pesticidas en alimentos de origen vegetal ni animal, acoplándose exclusivamente a normativas señaladas en otros países.

Otro límite a considerar y que tiene relación con la parte toxicológica es la IDA Ingesta Diaria Admisible, que según la directiva (EC) No 396/2005 es la estimación de la cantidad de sustancia presente en los alimentos, expresada en función del peso corporal, que puede ingerirse diariamente a lo largo de toda la vida sin provocar un riesgo apreciable para ningún consumidor, según todos los hechos conocidos en el momento de la evaluación y teniendo en cuenta los grupos vulnerables de población (por ejemplo, los niños y los no nacidos) [47].

En la Tabla IX se muestra los niveles de IDA para cada carbamato en estudio establecidos tanto por la comunidad europea y la FDA.

Tabla IX. Ingesta diaria admisible para Carbamatos en estudio [45, 46]

Carbamatos	FDA WHO	Comunidad Europea
	IDA ^a (mg.kg ⁻¹ peso corporal)	IDA (mg.kg ⁻¹ peso corporal)
ALDICARB	0.003	0.003
CARBARYL	0 - 0.008	0.0075
CARBENDAZIM	0.03	0.02
CARBOFURAN	0 - 0.001	0.001
EPT CARBAMATO	-	-
FENOXYCARB		0.053
INDOXACARB	0 - 0.01	0.006
METHOMYL	0.02	0.0025
METHIOCARB	0 - 0.02	0.013
OXAMYL	0.009	0.001
PROPAMOCARB	0 - 0.4	0.29
PROPOXUR		0.02
PIRIMICARB	0 - 0.02	0.035
PROPYZAMIDE		0.02

^a Ingesta diaria admisible

1.3. Técnicas analíticas de detección de carbamatos

1.3.1. Cromatografía

Las técnicas empleadas para la detección de carbamatos en su mayoría son por Cromatografía Líquida (HPLC) con espectrometría de masas [48, 49, 50]; pero también se han desarrollado técnicas con detectores más sencillos como el de Fluorescencia [51], o enzimáticas con buena correlación de resultados al compararlas con técnicas de espectrometrías de masas [52].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada define cromatografía como sigue (IUPAC, 1993) [53]:

‘La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (la fase estacionaria), mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una definida dirección. Una fase móvil se describe como "un fluido que se filtra a través o a lo largo del lecho estacionario en una dirección definida". Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido.’

Si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa GC. La cromatografía gaseosa se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, pero suelen presentar grandes dificultades si las sustancias a utilizar no son volátiles, si descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular. Se ha estimado que sólo un 20% de las sustancias orgánicas conocidas pueden separarse por GC sin tratamiento previo [54]. El gas utilizado como fase móvil en GC es simplemente un carrier del soluto y prácticamente no influye en la separación.

Cuando la fase móvil empleada es líquida hablamos de cromatografía líquida. En LC la fase móvil es un parámetro fundamental que gobierna la separación, ya que, con una sola columna es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares simplemente modificando la composición de la fase móvil [55].

Un sistema LC se puede considerar que consiste de cuatro componentes principales, como se detalla a continuación:

- un dispositivo para la introducción de la muestra o inyector
- una fase móvil
- una fase estacionaria
- un detector

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del solvente a través del sistema [55].

Como mencionamos anteriormente la fase móvil juega un rol fundamental en la separación por LC, para elegir un buen solvente se necesita considerar que posea las siguientes características: alto poder solubilizante en las muestras, baja reactividad, compatibilidad con el detector utilizado, adecuado punto de ebullición, baja viscosidad, seguro y con un alto grado de pureza.

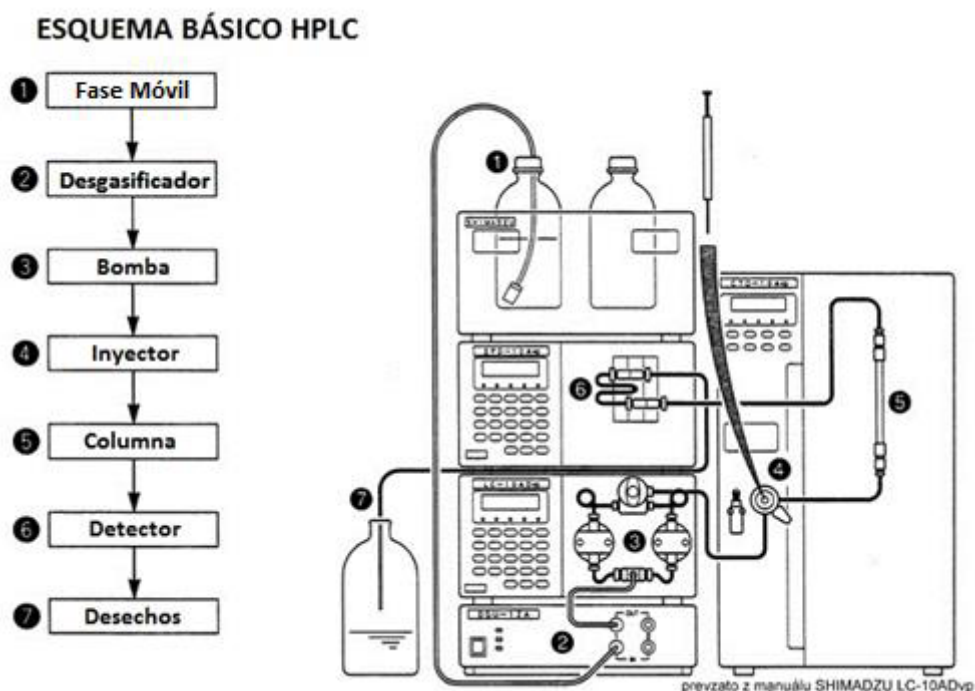


Figura 2. Esquema básico de un Cromatógrafo de Líquidos. Fuente: Shimadzu

En LC existe dos tipos de fase estacionaria comúnmente usada: la fase estacionaria normal (polar) y fase estacionaria reversa (no polar). La fase estacionaria más utilizada hoy en día es la fase reversa y utiliza de relleno el

octadecil silano o C18, para este tipo de columnas los solventes utilizados son orgánicos polares, como el metanol, acetonitrilo y agua.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica, sin el detector no se podría cuantificar ningún compuesto. Los detectores deben reunir ciertas características, entre ellas:

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta
- Poseer una respuesta lineal
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar
- Responder a todos los solutos
- Tener sensibilidad apropiada
- No afectarse por cambios de temperatura
- Poseer una buena relación señal/ruido

Estas propiedades han sido explicadas más ampliamente por Scott R, [56].

1.3.2. UPLC

Actualmente se trabaja con sistemas cromatográficos altamente eficientes, con reducción de los tiempos de análisis, menor gasto de solventes y mejorando considerablemente la resolución de los picos cromatográficos. A este sistema se le denomina UPLC (Cromatografía líquida de ultra performance). Estos equipos poseen un sistema de bombas binarias capaces de alcanzar presiones muy altas de hasta 15000 psi, cinco veces más que un equipo HPLC normal, y a flujos relativamente bajos del orden de 0.2 a 0.5 mL.min⁻¹, razón por la cual existe un menor gasto de tiempo y un menor consumo de la cantidad de solventes.

Para este tipo de sistemas se hace necesario la utilización de columnas especiales, empaquetadas con un relleno que contenga partículas de diámetro de 1.7 μ m y de longitud de la columna no mayor a los 100 mm, siendo columnas específicas para el uso en sistemas UPLC, no permitiendo su uso en sistemas convencionales.

1.3.3. Espectrometría de Masas

La combinación de una técnica de separación con un Espectrómetro de masas provee un poderoso método instrumental para el análisis científico. La espectrometría de masas MS es una técnica instrumental universal y específica, altamente sensible que permite la identificación inequívoca de una sustancia a través de su espectro de masas [57].

El principio de la espectrometría de masas es la producción de iones a partir de compuestos neutros y la observación de la subsiguiente descomposición de esos iones. Estos iones descompuestos (fragmentos que también poseen carga) se mueven rápidamente y son “clasificados” de acuerdo a su relación m/z (masa / nº de cargas del ion). El espectrómetro de masas no solo clasifica los fragmentos, sino que además mide la cantidad de ellos que se forman [58].

Un espectrómetro de masas siempre contiene un sistema de introducción del compuesto o una mezcla de compuestos; una cámara que ioniza dichos compuestos; uno o más analizadores de masas para separar los iones producidos; un sistema de detección o contador de iones y un procesador de datos [59]. Ver Figura 3.

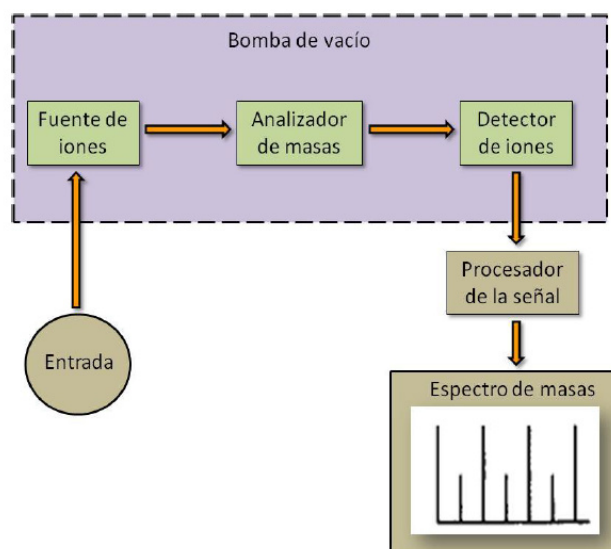


Figura 3. Componentes básicos de un espectrómetro de masas

Fuente: Waters

Tabla X. Tipos, características y limitaciones de las configuraciones más utilizadas en espectrometría de masas [58].

	TIPO	CARACTERÍSTICAS	LIMITACIONES
ACOPLAMIENTO GC	Ionización por impacto electrónico (EI)	• Universal (ioniza gran variedad de moléculas). • Muy reproducible (permite creación de librerías espectrales). • Moléculas se ionizan por bombardeo de un haz de electrones con carga de 70eV (generalmente).	• En algunos casos, excesiva fragmentación de moléculas. • Moléculas termolábiles se degradan al vaporizarse. • Solo espectros de masas de iones positivos. • Poco selectivo.
	Ionización química (CI)	• Es más suave y más controlable. (Menor descomposición de moléculas). • Obtención de iones quasimoleculares. Permiten determinar peso molecular. • Moléculas se ionizan por colisión con un gas reactivo. (Metano, amoníaco). • En función gas seleccionado, la ionización puede ser universal o selectiva.	• Poco reproducible. Las abundancias relativas de los iones presentan mayor variabilidad. Dificulta creación librerías espectrales. • Ionización en estado gaseoso: Moléculas termolábiles se degradan.
ACOPLAMIENTO LC	Ionización por electro spray (ESI)	• Permite obtener iones multicargados (posibilidad análisis péptidos y proteínas) • Funciona bien con ácidos y bases preformados en disolución y con compuestos a los que se les pueda inducir carga (analitos polares o con heteroátomos). • No utiliza temperaturas elevadas (permite análisis moléculas lábiles). • Se pueden obtener espectro de masas de iones positivos y negativos.	• Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). • Suelen formarse aductos con los tampones utilizados en la fase móvil de LC. • La sensibilidad es muy dependiente del flujo de fase móvil del LC y del pH de esta.
	Ionización química a Presión Atmosférica (APCI)	• Es una ionización química mediante reacciones ion-molécula a presión atmosférica. • Permite análisis de moléculas con bajo peso molecular no volátiles. • Su sensibilidad no depende el pH ni del flujo de fase móvil. • Más sensible que ESI. • Permite obtener EM de iones positivos y negativos.	• Es una ionización muy suave. Genera pocos fragmentos (poca información estructural). • Ionización se produce en fase gaseosa: algunas moléculas lábiles pueden descomponerse por la temperatura.

Como se puede observar en la Tabla X, existen 4 principales tipos de espectrómetros según su fuente de ionización. En cromatografía de gases la más utilizada es la ionización por impacto de electrones EI, donde las moléculas ionizadas son bombardeadas con electrones a una energía de 70 eV provocando su completa fragmentación. En Cromatografía líquida el sistema de ionización más utilizado es por electro spray ESI, este modo de ionización es indicado para moléculas polares; mientras que la ionización APCI es indicada para moléculas no polares.

En la presente tesis el equipo utilizado para la detección de los carbamatos fue un Cromatógrafo de líquidos acoplado con un espectrómetro de masas tandem,

conocido también como triple cuadrupolo, y con fuente de ionización por electrospray ESI, la cual pasaremos a describir en detalle a continuación.

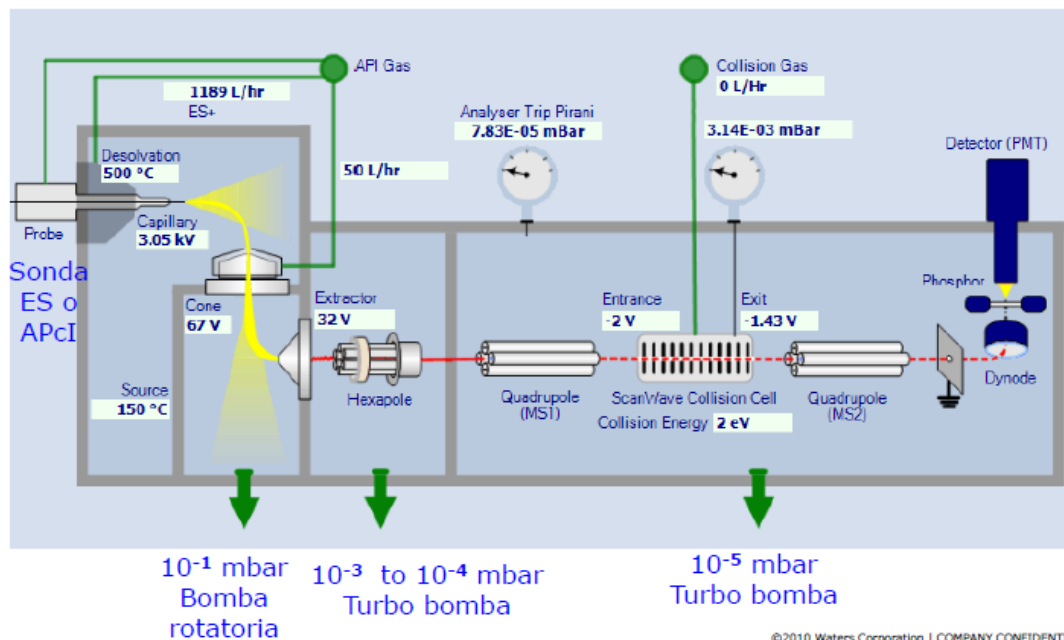


Figura 4. Esquema de un LC-MS/MS con ionización ESI

Fuente: Figura tomada del programa MassLynx

Como se muestra en la Figura 4 un LC-MS/MS está compuesto por una cámara de ionización a presión atmosférica, una interface con vacío moderado que dirige los iones al analizador, una región de alto vacío que contiene al primer cuadrupolo MS1 o también denominado Q1, la celda de colisión (también denominado tercer cuadrupolo), el segundo cuadrupolo MS2 o Q2 y el detector que es el encargado de amplificar, transformar y medir la señal de los iones analizados.

En la ionización por electrospray (ESI), un líquido, en el cual el analito de interés ha sido disuelto, pasa por una aguja hueca sometido a un campo eléctrico de 5 a 10 kV.cm⁻¹ a presión atmosférica. La corriente del líquido es dispersada formando gotitas altamente cargadas, denominada doplets, estas gotas son luego desolvatadas a medida que pasan a través de la región a presión atmosférica de la fuente hacia un electrodo contador. La desolvatación es promovida por una corriente de un gas altamente puro y seco, por lo general el gas utilizado es el nitrógeno, que se encuentra circulando continuamente en

la región de pulverización. Los analitos iónicos son obtenidos a partir de estos doplets que luego pasan hacia la región de alto vacío del espectrómetro de masas dirigiéndose donde se encuentran los analizadores o cuadrupolos [60], ver Figura 5.

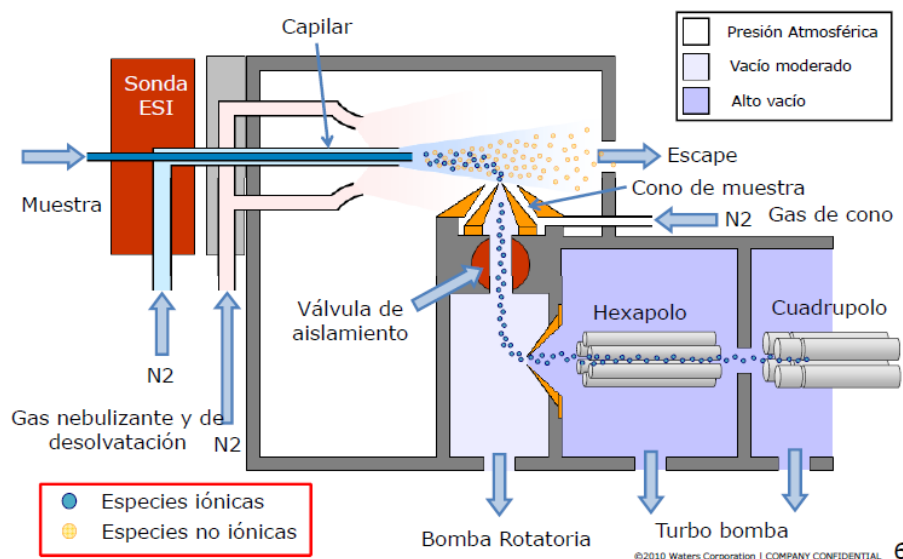


Figura 5. Esquema de la fuente de ionización ESI
Fuente: Waters

El analizador de masas tándem de triple cuadrupolo consiste en tres series de cuadrupolos en posiciones seguidas con respecto a los mismos, tal como se logra apreciar en la Figura 4. Los dos primeros cuadrupolos, el cuadrupolo 1 (Q1) y el cuadrupolo 2 (Q2) funcionan como dos analizadores, el tercer cuadrupolo que en realidad es una celda de colisión y que se encuentra situado entre los cuadrupolos Q1 y Q2 cumple una función más bien de fragmentación de la molécula precursora o ion padre que ha sido seleccionado previamente del Q1.

Un cuadrupolo es un conjunto de cuatro varillas paralelas equidistantes del centro y que a través de la aplicación de una combinación de voltajes alternos (RF) y continuos (DC) los iones pueden ser “filtrados” del eje central y su masa puede ser debidamente medida para obtener el espectro correspondiente, ver Figura 6.

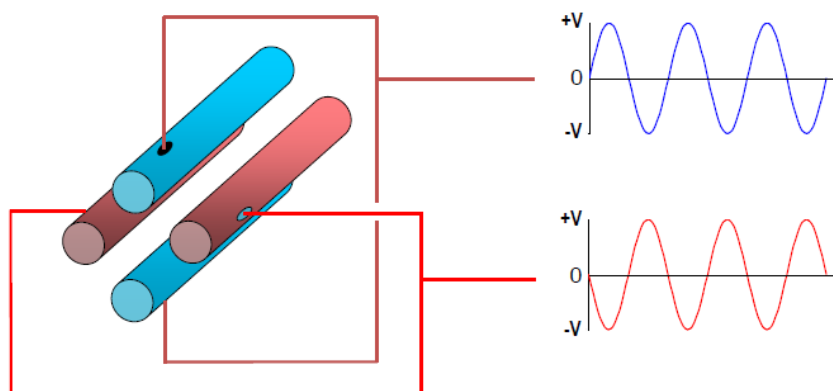


Figura 6. Esquema de un cuadrupolo con combinación de voltajes alternos y continuos. Fuente: Waters

Dependiendo del voltaje aplicado, los iones de masas muy pequeñas o muy grandes no pasarán a través del cuadrupolo. Estos iones eventualmente chocarán contra una de las varillas y serán automáticamente destruidos, de acuerdo a lo observado en la Figura 7.

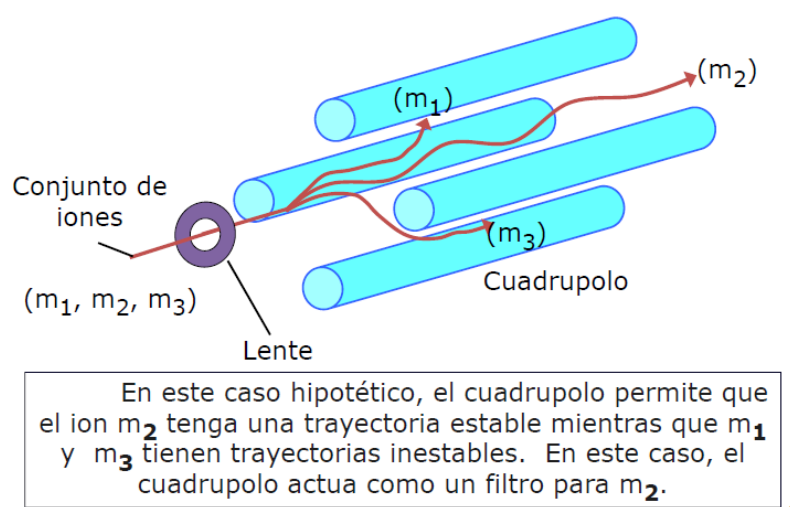


Figura 7. Trayectoria de iones a través del cuadrupolo
Fuente: Waters

La celda de colisión es un cuadrupolo especial en el que se aplica una energía, llamada energía de colisión (CE), que permite fragmentar los iones obtenidos en la fuente de ionización y que han sido seleccionado del Q1. Esta energía puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener diversos espectros de

masas en los que aparecerán los iones hijos característicos a la molécula seleccionada y con diferentes relaciones de intensidad entre ellos.

Los iones hijos m/z seleccionados que han atravesado los analizadores llegan a un Dinodo de conversión cuya función es cambiar la señal del ion a fotones de energía, estos fotones viajan en paquetes de energía hacia el fotomultiplicador donde al chocar con el fotocátodo producen un electrón. Este electrón es atraído hacia el primer dinodo, gracias a una diferencia de potenciales, y al chocar con el primer dinodo, varios electrones son eyectados, aumentando de esta manera la señal. Cada dinodo está posicionado a mayor voltaje lo que origina que los electrones se dirijan al siguiente dinodo creando un número mayor de electrones. Al chocar con el ánodo, se genera una señal que es grabada como intensidad de corriente., ver Figura 8.

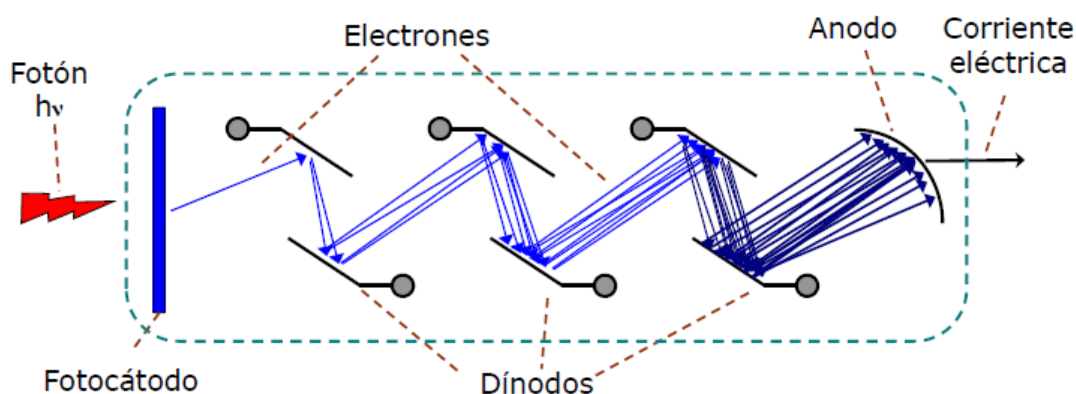


Figura 8. Esquema de un fotomultiplicador. Fuente: Waters

1.3.4. Adquisición de los datos

Los principales tipos de adquisición de datos que se pueden realizar en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo son: MS Scan, Selected-ion recording SIR, Daughter ion scan y Multiple reaction monitoring MRM.

En el MS Scan o escaneo de masas se obtiene la información de los espectros de un conjunto o familia de compuestos. Es un barrido de masas hecho a la muestra inyectada, en la Figura 9 se observa un escaneo a la familia de los ibuprofenos.

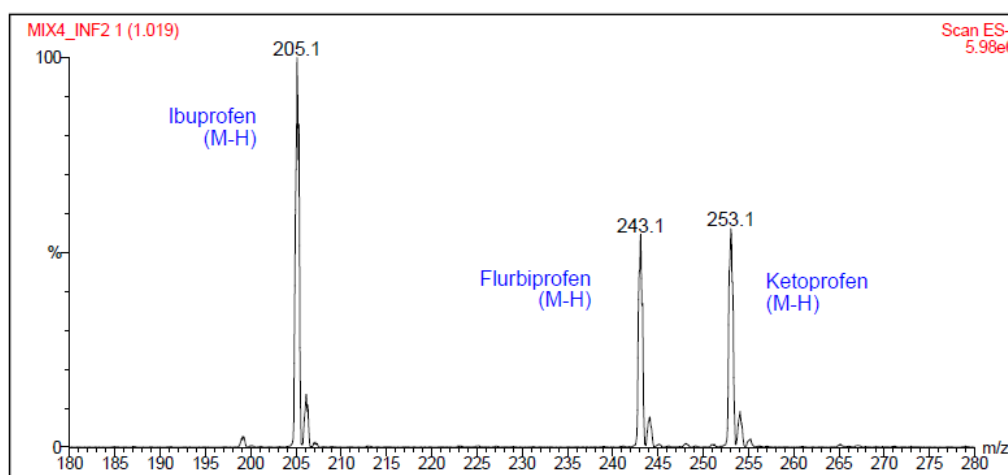


Figura 9. Espectro de masas de la familia del Ibuprofeno
Fuente: Programa MassLynx, Waters.

El método SIR se usa sólo para monitorear un analito con un m/z específico, en espectrómetros de masas con cuadrupolos simple este modo de adquisición es usada como método de cuantificación, ver Figura 10.

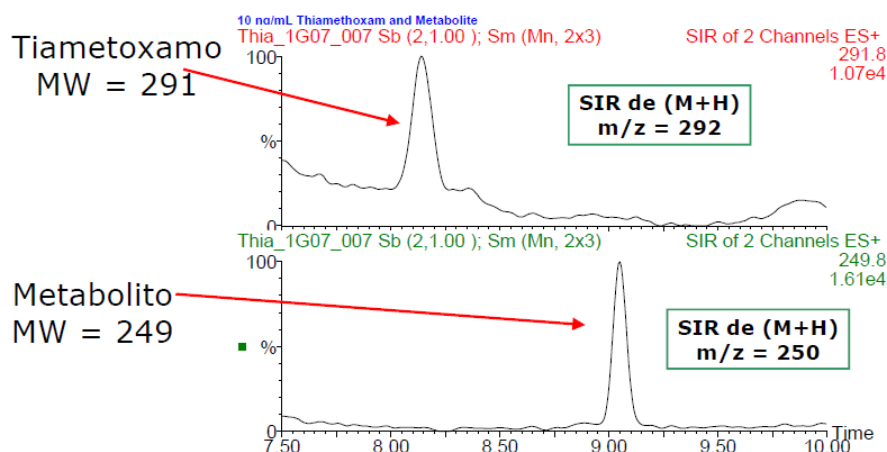


Figura 10. Modo SIR cromatograma de tiametoxamo y su metabolito.
Fuente: Programa MassLynx, Waters.

El daughter ion scan se utiliza para generar los espectros típicos de MS/MS que pueden producir información estructural de un ion precursor o padre. El ion padre es fragmentado en la celda de colisión y los fragmentos (hijos) son monitoreados en Q2. Es un método cualitativo en espectrometría de masas tándem.

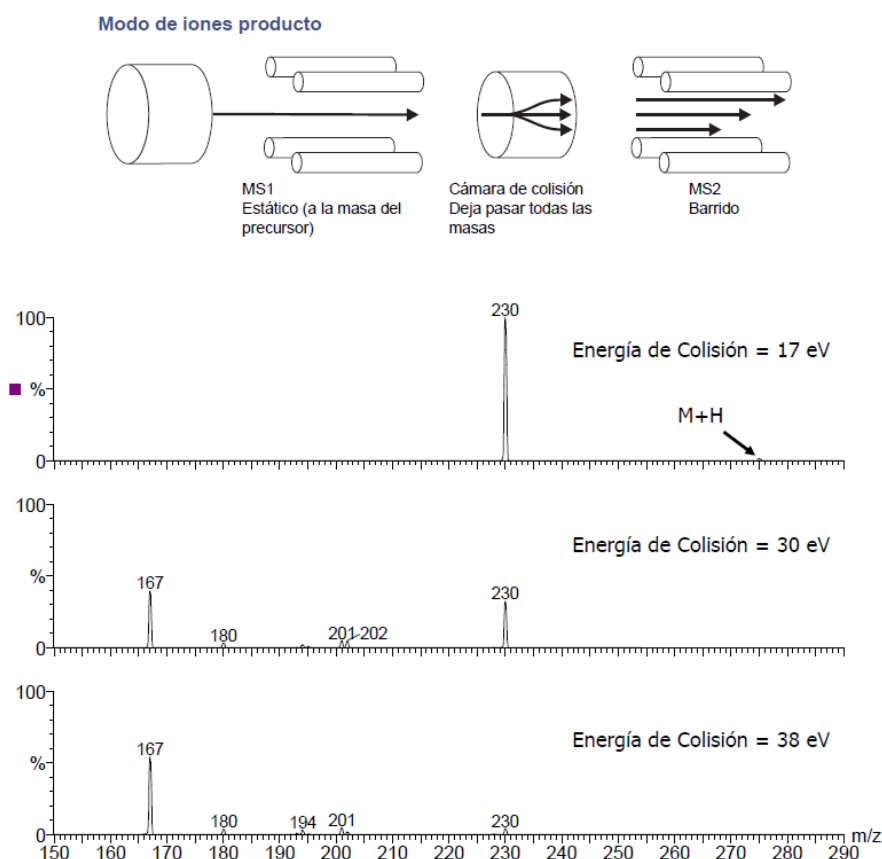


Figura 11. Daughter Scan. Espectros a tres diferentes energías de colisión: 17 eV se observa la masa del ion precursor 230 m/z; 30 y 38 eV disminuye la masa del ion precursor e incrementan la de los iones hijos 160, 180 y 201 m/z. Fuente: Waters, Diseño esquema del autor.

El MRM o monitoreo por reacción múltiple se usa para monitorear un analito específico. Es la forma **típica de cuantificación** en sistemas de cuadrupolo en función tándem. El ion padre (seleccionado en Q1) es fragmentado en la celda de colisión a una determinada energía de colisión y sólo el o los fragmentos más intensos son monitoreados en Q2 [61].

Este modo de adquisición brinda una alta selectividad y especificidad a los sistemas de espectrometría de masas tándem pues de manera inequívoca permite diferenciar compuestos de masas moleculares similares pero con iones productos diferentes de acuerdo a sus características de fragmentación, tal y cual como se observa entre el ketoprofeno y fenbufeno, con un m/z de 255 para ambos, que en modo SIR no se logran diferenciar en el cromatograma, pero al aplicar el modo MRM, cada uno presenta iones hijos característicos, permitiendo con esto su completa diferenciación, ver figura 12.

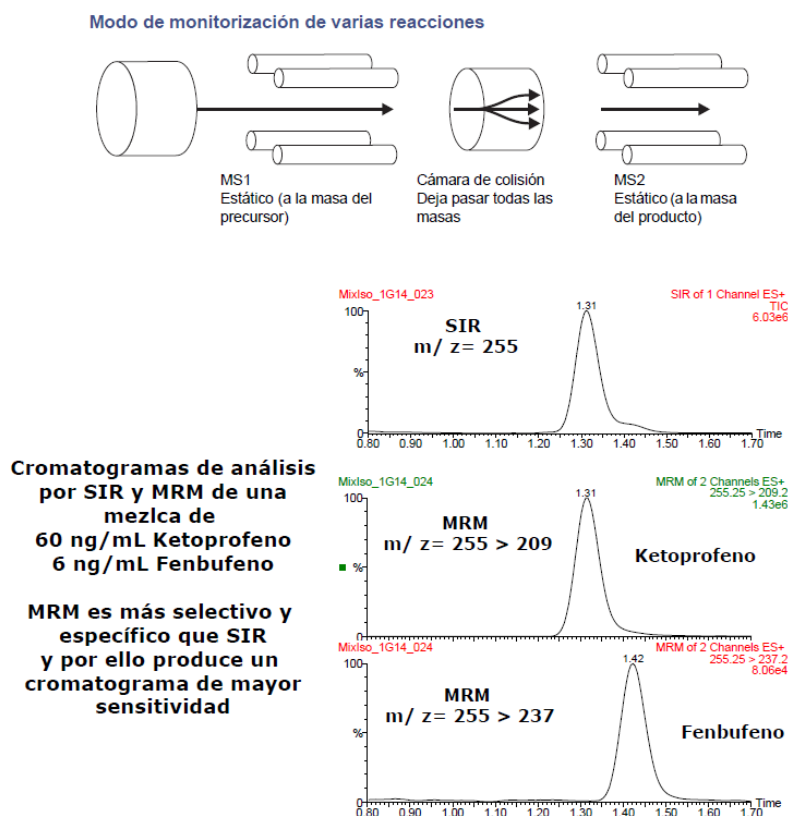


Figura 12. Modo MRM, diferencias entre SIR y MRM.
Fuente: Waters, esquema del autor.

1.4. Validación de métodos analíticos

La validación de los métodos analíticos utilizados en las actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de los resultados, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

En el presente estudio se realizó una validación interna, lo que significa que fue realizada por un solo laboratorio, utilizando el mismo método para proceder con los análisis, separados por largos intervalos de tiempo justificados, de idénticos o diferentes materiales de ensayo en condiciones distintas, como diferentes analistas [1].

Para el presente estudio los parámetros de desempeño a considerar en la validación serán: especificidad, linealidad de la curva de calibrado, Límite de cuantificación LOQ, Límite de detección LOD, recuperación, precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia, de acuerdo a lo indicado en la normativa EC/657/2002 de la comunidad europea para residuos de plaguicidas.

1.4.1. Especificidad

Es la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias que pudiesen estar presentes en la matriz en estudio. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz (EC 657/2002). No existe una expresión única para la especificidad. Es más bien algo que debe demostrarse. La forma en que este se realiza depende del objetivo y el tipo de análisis método [62]. Se dice que un método es específico cuando es 100% selectivo [63].

La ausencia de resultados falsos positivos para todas las muestras blancas en los respectivos ensayos serán considerados aceptables para demostrar selectividad.

1.4.2. Linealidad de la curva de calibrado

La linealidad es la capacidad del método de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito. En cuanto al rango de calibración de un método analítico se considera que es el intervalo entre la concentración superior e inferior del analito en la muestra en la cual debe existir precisión, exactitud y linealidad. Este intervalo de calibración debe ser elegido con el fin de cubrir la mayor parte de las concentraciones esperadas en muestras reales [64].

La EC 657/2002 recomienda en cuanto a curvas de calibrado: emplear al menos cinco niveles (incluyendo el cero) en la construcción de la curva; describir la fórmula matemática de la curva, la bondad del ajuste de los datos a la curva; y describir los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.

1.4.3. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es definido como la concentración más baja del analito en la cual se puede obtener aceptables niveles de recuperación y precisión.

1.4.4. Límite de Detección

El límite de detección se define como la concentración más baja de analito en la muestra en la que la relación señal-ruido (S / N) tiene que ser de al menos 3:1. Una manera estadística de encontrar el LOD es a través de la ecuación lineal donde se toma el valor de lectura del blanco y se le suma tres veces su desviación estándar.

$$LOD = \hat{y}_{blanco} + 3S_{blanco} \quad (1)$$

1.4.5. Precisión

Precisión es el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas. De aquí se desprenden dos términos: Repetibilidad que es el grado de concordancia entre

resultados de ensayos bajo condiciones similares en un intervalo de tiempo corto, y Reproducibilidad como el grado de concordancia entre resultados independientes bajo diferentes condiciones, tales como: analistas, equipos, reactivos, y principalmente diferentes laboratorios. Cuando la reproducibilidad no incluye dos laboratorios diferentes, se denomina reproducibilidad intermedia. La normativa EC 657/2002 recomienda el siguiente proceso para el cálculo de repetibilidad:

- Prepare un conjunto de muestras de matrices idénticas, enriquecidas con el analito para dar concentraciones equivalentes a 1, 1.5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0.5, 1 y 1.5 veces el límite permitido.
- En cada nivel debe procederse al análisis con un mínimo de 6 muestras idénticas.
- Analice las muestras.
- Calcule la concentración detectada en cada muestra.
- Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.
- Repita estos pasos al menos otras dos veces.
- Calcule las concentraciones medias generales y los CV de las muestras enriquecidas.

Para el cálculo de reproducibilidad intermedia repetir estos pasos al menos otras dos veces con operadores diferentes y distintas condiciones ambientales (por ejemplo, diferentes lotes de reactivos, disolventes, temperaturas ambientales, instrumentos, etc.).

1.4.6. Veracidad

Es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado, este valor de referencia aceptado puede ser un material de referencia certificado MRC. Cuando no se dispone de MRC, debe determinarse la veracidad en términos de recuperación mediante experimentos con matriz en

blanco enriquecido a niveles establecidos (EC 657/2002), por ejemplo mediante el procedimiento siguiente:

- seleccione 18 alícuotas de un material en blanco y enriquezca cada 6 de ellas con 1, 1.5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0.5, 1 y 1.5 veces el límite permitido,
- analice las muestras y calcule la concentración en cada muestra,
- calcule la recuperación media y el CV de los 6 resultados a cada nivel.

1.4.7. Incertidumbre en la medición

La incertidumbre se define como “un parámetro, asociado al resultado de una medida, que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuidos al mensurando”. En esta definición el mensurando indica: “la propiedad sujeta a medida” (BIPM) [65].

Cuando es presentado un resultado de medición, sea una calibración, ensayo o una simple medición, es importante que se exprese alguna indicación cuantitativa de la calidad del resultado de tal forma que aquellos que lo utilizan puedan evaluar su confiabilidad. Este intervalo de confianza es lo que conocemos como incertidumbre de la medición, siendo generalmente expresada con aproximadamente un 95% de confianza [66].

Existen dos métodos para cuantificar la incertidumbre: el método de evaluación Tipo A que está basado en un análisis estadístico de una serie de mediciones; y el Método de evaluación tipo B que comprende todas las demás maneras de estimar la incertidumbre [67].

Incertidumbre tipo A.

Se puede considerar como fuente de incertidumbre tipo A, a las incertidumbres obtenidas por cálculos estadísticos, tales como: incertidumbre por desviación estándar relativa de la reproducibilidad intermedia (ecuación 2), la incertidumbre arrojada por la curva de calibrado (ecuación 3), según las ecuaciones:

$$u_{Reprod} = \frac{DS_{WR}}{\bar{x}} \quad (2)$$

Donde DS_{WR} es la desviación estándar por reproducibilidad intermedia en el nivel de concentración dado y $\bar{x}$ es la media de los valores obtenidos para dicha concentración.

$$u_{cc} = \frac{S_{xo}}{\bar{x}} \quad (3)$$

$$S_{xo} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (5)$$

Donde;

S_{xo} es el error asociado a la concentración por la curva de calibrado

$S_{y/x}$ es la desviación estándar residual, ver ecuación 5,

b es la pendiente de la curva de calibrado,

m es el número de lectura para cada medición,

n es el número de puntos de calibración,

y_o es el valor experimental de y a partir del cual se determinó x_o

Incertidumbre tipo B.

Como fuente de incertidumbre de tipo B de una magnitud de entrada se usa información externa u obtenida por experiencia. Las fuentes de información pueden ser:

- Certificados de calibración.
- Manuales del instrumento de medición, especificaciones del instrumento.
- Normas o literatura.
- Valores de mediciones anteriores.
- Conocimiento sobre las características o el comportamiento del sistema de medición [68].

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en su parte analítica en el área de Instrumental de la Empresa World Survey Services del Ecuador con los equipos e instrumentos señalados en el capítulo de Equipos. El trabajo de campo fue realizado en los mercados y supermercados seleccionados para la toma de muestra de los tomates riñón.

2.1. Reactivos

Los estándares certificados de Aldicarb 98.8% (2-Metil-2-(metiltio)propionaldehído-O-metilcarbamoiloxima), Carbaryl 99.5% (1-naftil metilcarbamato), Carbendazim 99.5% (Metil benzimidazol-2-ilcarbamato), Carbofuran 99.5% (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato), EPTCarbamato 99.0% (S-etil dipropiltiocarbamato), Fenoxycarb 98.8% (Etil 2-(4-fenoxi)Etilcarbamato), Indoxacarb 99.5% (metil (S)-N-[7-cloro-2,3,4a,5-tetrahidro-4a-(metoxicarbonil)indeno[1,2-e][1,3,4]oxadiacin-2-ilcarbonil]-4'-(trifluorometoxi) carbanilato), Methiocarb 99.5% (4-metiltio-3,5-xilil metilcarbamato), Methomyl 99.5% (S-metil (EZ)-N-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato), Oxamyl 99.5% ((EZ)-N,N-dimetil-2-metilcarbamoiloxiimino-2-(metiltio)acetamida), Pirimicarb 99.5% (2-dimetilamino-5,6-dimetilpirimidin-4-il dimetilcarbamato), Propyzamide 98.3%

(3,5-Dicloro-N-(1,1-dimetilpropinil)benzamida), Propamocarb (Clorhidrato de Propil 3-(dimetilamino) propil carbamato), Propoxur 99.5% (2-isopropoxifenil metilcarbamato) fueron suministrado por Chem Services, Inc (West Chester, Pensylvania, USA).

El Acetonitrilo grado HPLC y el metanol grado HPLC fueron suministrados por MERCK (Darmstadt, Alemania), el agua fue obtenido de una unidad de purificación DirectQ5 de Millipore (Bedford, Massachusetts, USA), el dimetilsulfoxido y el ácido acético, fueron suministrados por MERCK (Darmstadt, Alemania), el ácido fórmico fue suministrado por Panreac Química S.A. (Barcelona, España).

Los tubos de extracción Quechers AOAC (6g MgSO₄ anhidro, 1.5g acetato de amonio anhidro) fueron suministrado por Thermo Fisher (Runcorn, Reino Unido), los tubos de limpieza Disque AOAC/C18 (150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, 50mg C₁₈) fueron suministrados por Waters (USA).

2.2. Equipos

La detección fue llevada a cabo en un Espectrómetro de masas XEVO TQ MS con fuente de ionización por Electro Spray en modo ESI+ (WATERS, Reino Unido). Los analitos en estudio fueron separados en un cromatógrafo de líquidos UPLC Acquity BSM (WATERS, Reino Unido).

Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron los siguientes equipos: una Balanza analítica Mettler Toledo modelo XS 105 DU (Greifensee, Suiza), un Multivortex Heidolph modelo Multi Reax (Schwabach, Alemania), un vortex ZX Classic Micro Velp Scientific (Usmate MB, Italia), una microcentrifuga modelo Mini Spin 5452 Eppendorf AG (Hamburg, Alemania), una centrifuga modelo MP4R IEC, dos micropipetas Rainin Pipet Line con volumen variable de 100 a 1000 uL y de 10 a 100 uL de Mettler Toledo (Greifensee, Suiza).



Figura 13. Módulo de separación Acquity BSM acoplado a un espectrómetro de masas XEVO TQ-MS con ionización por electrospray ESI

2.3. Metodología

2.3.1. Establecimiento de condiciones cromatográficas

El cromatógrafo de líquidos Acquity BSM fue ajustado inicialmente de acuerdo al procedimiento establecido por Leandro 2007 [71].

Las condiciones cromatográficas a tomar en consideración en el desarrollo del método son: la fase móvil, que de acuerdo a la literatura se puede considerar una combinación de agua-metanol como medio de separación de los carbamatos; el flujo de la fase móvil; establecer un gradiente de la fase móvil, cambios de la proporción de la fase móvil con respecto al tiempo; una columna cromatográfica diseñada exclusivamente para el trabajo en equipos UPLC con química C18; una adecuada temperatura de la columna que permita una mejor resolución y menor tiempo de análisis; la temperatura del automuestreador que permita conservar los extractos colocados en los viales; y el volumen de inyección del extracto dentro de la columna.

2.3.2. Establecimiento de condiciones espectrométricas

Una parte de los parámetros experimentales utilizados en la fuente de ionización del espectrómetro de masas XEVO TQ MS son establecidos por defecto en la calibración inicial del instrumento realizada por un técnico especializado en calibración, de los cuales cabe mencionar lo siguiente:

LM 1 Resolution	2.7
HM 1 Resolution	15.0
Ion Energy 1	0.5
LM 2 Resolution	2.8
HM 2 Resolution	14.7
Ion Energy 2	0.7
Ganancia	1.00
Fotomultiplicador	517.22

Los demás parámetros y que son los más relevantes dentro del desarrollo espectrométrico son: la polaridad, el voltaje del capilar, los voltajes del cono (exclusivo de cada analito), el voltaje del extractor, temperatura de desolvatación, flujo de los gases de desolvatación, del cono y de colisión. Estos serán ajustados dentro del desarrollo del método.

El valor m/z de los iones precursores serán tomados inicialmente a partir de su masa molecular protonada $[MH]^+$.

La detección mediante Espectrometría de masas tándem (MS/MS) será mediante la selección de los iones productos de acuerdo a monitoreo por reacción múltiple MRM, la información de los MRM de cada carbamato serán seleccionados de la biblioteca QUAMPEDIA del Software Masslynx V4.1 SCN810 Waters inc, y estos datos serán confirmados mediante un seteo de masas realizado automáticamente por el equipo XEVO TQMS mediante el programa IntelliStar del software Masslynx.

2.3.3. Preparación de las soluciones estándar

- **Solución Stock de Carbamatos: (1000 mg.L⁻¹)**

Pesar de manera independiente: 10 ± 0.1 mg de cada uno de los estándares de Carbamatos en un balón volumétrico de 10 mL, (considerando la pureza del estándar al momento de realizar los cálculos para el pesaje). Disolver en metanol HPLC, sonicar si es necesario y llevar al aforo con metanol HPLC. Transferir a frasco de color ámbar y almacenar en un congelador.

- **Solución Mix de trabajo: 10 ug.mL⁻¹ y 1 ug.mL⁻¹**

Pipetear 100 µL de la solución stock estándar de cada Carbamato en matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol HPLC. Transferir a frasco de color ámbar y almacenar en un congelador. Pipetear 5 mL de la solución mix 10 µg.mL⁻¹ de Carbamatos en un matraz volumétrico de 50 mL, mezclar y llevar a volumen con metanol HPLC. Transferir a un frasco de color ámbar y almacenar en un congelador.

2.3.4. Preparación de las muestras

Actualmente para la extracción de pesticidas se está utilizando ampliamente la metodología Quechers. Este método es robusto, de fácil empleo y abarata costos en los análisis por la poca utilización de solventes. La robustez del método para una cantidad amplia de matrices y diversos tipos de analitos han sido discutido ampliamente por Lehotay, 2010 [72].

El procedimiento para la extracción de carbamatos en tomates riñón es el siguiente:

Pesar 10.0 ± 0.005 g de muestra previamente homogeneizada en un tubo plástico de 50 mL, con tapa rosca. Fortificar las muestras tomadas como blancos mediante adición de soluciones patrón de trabajo de carbamatos según lo indicado en la Tabla XI para la preparación de la Curva de calibración por adición de estándar externo.

Tabla XI. Preparación de la curva de calibrado

Curva Calibración $\mu\text{g.kg}^{-1}$	Mezcla Carbamatos Solución $10.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Volumen (μL)	Mezcla Carbamatos Solución $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Volumen (μL)
Blanco	-	-
Fortificado 1: 2.5		25
Fortificado 2: 5.0		50
Fortificado 3: 10.0		100
Fortificado 4: 20.0	20	
Fortificado 5: 40.0	40	
Fortificado 6: 80.0	80	

Adicionar 15 mL de una solución de Acetonitrilo HPLC acidificado con Ác. Acético al 1%. Vortear el tubo por un minuto para lograr la reacción completa entre la muestra y la solución de fortificación.

Trasvasar el contenido del Tubo de extracción QUECHERS al tubo que contiene la muestra, agitar vigorosamente por un minuto y posteriormente centrifugar por 10 minutos a 3500 r.p.m.

Transferir 1 mL del extracto de acetonitrilo y adicionarlo en el tubo 2 de limpieza Quechers que contiene 50 mg de Amina Primaria Secundaria PSA y 150 mg de sulfato de magnesio. Vortear por 1 minuto y posteriormente centrifugar a 12000 r.p.m en una microcentrífuga por dos minutos.

Transferir 200 μL del extracto final a un vial previamente rotulado y diluir con 800 μL de Fase Móvil A.

Colocar los respectivos viales en el automuestreador de acuerdo a una secuencia establecida de inyección.

2.3.5. Adquisición y procesamiento de datos

El modo de adquisición de los iones precursores e iones productos será por Monitoreo de Reacción Múltiple, MRM. Estos datos serán procesados por el paquete TargetLynx del Software Masslynx V4.1 SCN810 Waters inc, previa la introducción de la información correspondiente obtenida dentro del desarrollo del método para cada analito estudiado.

CAPÍTULO III

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. Selección del área de estudio

La ciudad de Guayaquil cuenta con una población de más de 2.5 millones de habitantes, para lograr un abastecimiento de alimentos para toda esta población el municipio cuenta con una red de 38 mercados establecidos estratégicamente en la ciudad, sumado a estos existen 30 grandes cadenas privadas de supermercados en Guayaquil, dando un total de 68 centro de abastos importantes en toda la ciudad. Del total de centro de abastos se han seleccionado 6 mercados y 4 supermercados distribuidos en todas las latitudes de la ciudad, tal como se muestra en la figura 14. La lista de los mercados seleccionados y su dirección exacta se detalla a continuación:

- **Mercado 1**, Gnral. Robles y la “H”, Vía de Ingreso Ave. Domingo Comín, Barrio Cuba.
- **Mercado 2**, Gómez Rendón y Chimborazo, Parroquia Olmedo.
- **Mercado 3**, Cuenca y Nicolás Segovia.
- **Mercado 4**, km 16 de la vía a Daule, a la altura de la ciudadela Montebello.
- **Mercado 5**, Calle 5ta y Callejón 6to, Vía de ingreso Km. 6 ½ de la Vía Daule – Guayaquil.
- **Mercado 6**, Cdla. Sauces IX, Ave. Dr. Parra Velasco, entre mz 518 y 550 frente a Sauces III.

-

FCNM

3.2. Muestreo

Se realizará un monitoreo de los niveles presentes de carbamatos en los diez centro de abastos seleccionados durante un mes, tomando una muestra en cada centro de abasto cada semana por cuatro ocasiones diferentes.

Cada muestra tomada en cada punto de muestreo se tornará en una muestra de laboratorio [2] a la cual se le hará un ensayo por duplicado en el mismo día del muestreo. Obteniendo resultados semanales de los niveles de carbamatos en los diez centros de abastos seleccionados. Se contará al final del mes con un total de 40 resultados.

La cantidad de muestra a tomar en cada centro de abasto será de acuerdo a lo que describe la Normativa 2002/63/CE [2] de la Comunidad europea para productos alimentarios primarios de origen vegetal, la cual especifica lo siguiente: para productos frescos de tamaño medio, generalmente unidades de 25 – 250 g, la cantidad a tomar será de 1 kg o al menos 10 unidades.

La muestra de laboratorio (10 unidades) se homogeneizará completamente y se colocarán en envases limpios y herméticos para evitar su contaminación, daño o pérdida. Se rotularán de acuerdo a la procedencia. Se tomará una porción analítica y la contramuestra se congelará a -20 °C como respaldo ante cualquier eventualidad durante el desarrollo de los análisis.

3.3. Programa y objetivos de validación

Para la comprobación de la idoneidad del método propuesto, y demostrar que cumple con la necesidad analítica establecida: determinar residuos de carbamatos a niveles del rango de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ o partes por billón en muestras de tomate riñón, se realizó un programa de validación con los objetivos de validación según directrices de la Unión Europea EC 657/2002 [1], tomando a consideración los criterios relativos a dicha norma establecidos en la SANCO 12495/2011 [69] y directrices sobre niveles de incertidumbre del Codex Alimentarius CAC/GL 59-2006 [70] detallados en la tabla XII y XIII respectivamente.

Tabla XII. Programa de Validación de Residuos de Carbamatos en muestras de tomate riñón

	Curva de calibrado***	Muestras de Validación						Selectividad	Total de muestras
		Analista 1*			Analista 2**				
		Repetibilidad y Recuperación			Reproducibilidad intermedia y Recuperación				
		5 ug.kg ⁻¹	10 ug.kg ⁻¹	15 ug.kg ⁻¹	5 ug.kg ⁻¹	10 ug.kg ⁻¹	15 ug.kg ⁻¹		
Primer día	6 niveles + blanco	6	6	6	-	-	-	20 blancos	45
Segundo día	6 niveles + blanco	-	-	-	6	6	6	-	25
Tercer día	6 niveles + blanco	6	6	6	-	-	-	-	25

* Analista 1: Michael Rendón Morán

**Analista 2: Lisbeth Guerrero Minga

*** Rango de trabajo: 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 ug/kg

Tabla XIII. Objetivos de validación

Parámetro	Criterio	Directiva	Comentario
LOQ	5 ug.Kg ⁻¹	EC 657/2002	Valor menor a 10 ug.kg ⁻¹ (valor por defecto en límites máximos permitidos cuando no existe un LMR establecido)
Linealidad	$r > 0.98$	SANCO 12495/2011	Curva de calibrado ponderada a 1/x
Recuperación	70 - 120 %	SANCO 12495/2011	Niveles: 5, 10 y 15 ug.kg ⁻¹
Repetibilidad	< 20 % RSD _{wr}	SANCO 12495/2011	Niveles: 5, 10 y 15 ug.kg ⁻¹
Reproducibilidad intralaboratorio	< 20 % RSD _{wR}	SANCO 12495/2011	Niveles: 5, 10 y 15 ug.kg ⁻¹
Selectividad	La ausencia de resultados falsos positivos para todas las muestras		
Incertidumbre	< 50 %	CODEX CAC/GL 59-2006	Valor por defecto para análisis de compuesto trazas

3.4. Análisis estadístico de datos de validación

Para el ajuste de las curvas de calibrado se procederá a realizarla mediante regresión ponderada 1/x, con la finalidad de que los puntos más altos no den un mayor peso en el cálculo de la regresión. En los análisis correspondientes a la curva de calibrado se obtendrá una ecuación lineal que establezca la relación entre las variables de entrada (concentración) y salida (señal). Por cada carbamato se obtendrá un intercepto y una pendiente promedio como resultado de un análisis de regresión ponderado para las tres curvas de calibrado realizadas durante la validación. Se determinará el coeficiente de correlación cuadrático (r^2) mínimo obtenido entre las tres curvas, y los respectivos intervalos de confianza del promedio de curvas y los intervalos de predicción para el grupo de curvas realizado en toda la validación.

Mediante la ecuación de la curva de calibrado se obtendrá los límites de detección LOD correspondientes a cada analito estudiado, de acuerdo a la ecuación 1.

Los porcentajes de recuperación para cada nivel fortificado se obtendrán mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = 100 \times \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Nivel enriquecido}} \quad (6)$$

Los datos de precisión por repetibilidad (intra grupos) y reproducibilidad intermedia (entre grupos) por nivel fortificado, serán tomados a partir de un análisis de varianza de un factor.

Los análisis de regresión ponderados serán realizados mediante la aplicación del software Statgraphics centurión XVI.I, el software Minitab 15 y los análisis de recuperación y análisis de variancia de un solo factor mediante el uso de fórmulas y hojas de datos del programa Excel 2010.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Método desarrollado

4.1.1. Condiciones cromatográficas

Para establecer las condiciones cromatográficas se tomó de guía las condiciones experimentales establecidas por Leandro 2007 [71].

Los ajustes en los parámetros fueron los siguientes: el aumento de la temperatura de 40°C a 45°C, este incremento en la temperatura se utilizó para disminuir el tiempo de retención T_R de los carbamatos en la corrida cromatográfica y mejorar su resolución.

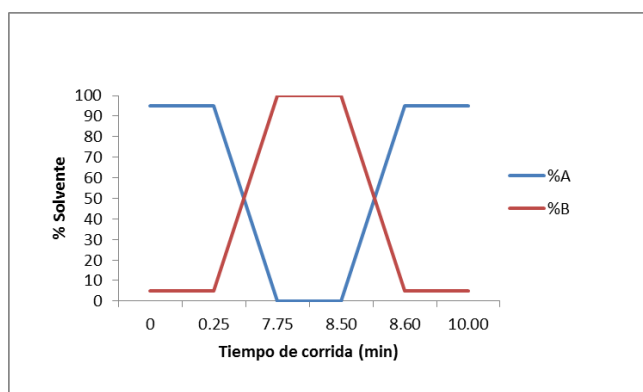


Gráfico 2. Gradiente cromatográfico

La corrida fue establecida en modo gradiente. La proporción de cada una de las fases móviles frente a los tiempos de corrida, son presentados en la Tabla XIV y en el gráfico 2. En la fase móvil A como en la B se le agregó 0.1 % de ácido fórmico con la finalidad de promover la protonación de las moléculas de carbamatos, cargándolas positivamente, facilitando con esto su ionización.

La temperatura del automuestreador quedó establecida en 10 °C para permitir la conservación del extracto durante el tiempo total de un set de análisis.

El tipo de columna utilizada fue fase reversa con ocatadecilsilano, conocida también como C18. Se utilizó la columna con una longitud de 10 mm para tener mayor superficie de separación y mejorar la resolución de los analitos eluidos, esta columna puede soportar una cantidad mayor de volumen inyectado y un mayor número de analitos a separar. Para proteger su vida útil se utilizó una pre-columna con la misma composición química, pero con una longitud menor a la columna (5 mm).

En resumen las condiciones cromatográficas quedaron establecidas de la siguiente manera:

- Fases móviles:
 - A. 98:2 agua/methanol 0.1 % ácido fórmico
 - B. Metanol 0.1 % ácido fórmico
- Columna: UPLC BEH C18 1.7um, 2.1x100mm
- Precolumna: UPLC BEH C18 1.7um, 2.1x5mm
- Flujo: 0,45 mL.min⁻¹
- Tiempo de corrida: 10 minutos
- Volumen de inyección: 10 µL
- Temperatura de la columna: 45°C
- Temperatura del muestreador: 10°C
- Tiempo de corrida: 10 min.
- Modo de corrida: Gradiente, ver Tabla XIV.

Tabla XIV. Gradiente cromatográfico desarrollado para la determinación de carbamatos

<i>Tiempo (min)</i>	<i>Flujo mL/min</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>	<i>Curva</i>
0	0.450	95	5	
0.25	0.450	95	5	6
7.75	0.450	0	100	6
8.50	0.450	0	100	6
8.60	0.450	95	5	6
10.00	0.450	95	5	6

El tiempo máximo de corrida quedó establecido en 10 minutos, este valor está muy por debajo con respecto a los métodos desarrollados por HPLC donde existen corridas que duran más de 35 minutos [49], esto demuestra un claro ejemplo de la gran ventaja que existe entre un UPLC y un HPLC en cuanto al ahorro de tiempo de análisis.

En la tabla XV se puede observar los tiempos de retención para cada carbamato de acuerdo a la gradiente que se fijó en el método desarrollado. El primer carbamato en eluir es el propamocarb al minuto 1.82 y el último el Indoxacarb al minuto 6.94.

Tabla XV. Tiempo de retención (min.) de los Carbamatos en estudio

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de retención T_R (min)</i>	<i>Ventana T_R ($\pm$ min)</i>
<i>Propamocarb</i>	1.82	0.13
<i>Oxamyl</i>	2.23	0.09
<i>Carbendazim</i>	2.26	0.12
<i>Methomyl</i>	2.38	0.09
<i>Pirimicarb</i>	3.54	0.11
<i>Aldicarb</i>	3.99	0.10
<i>Propoxur</i>	4.55	0.09
<i>Carbofuran</i>	4.60	0.11
<i>Carbaryl</i>	4.80	0.09
<i>Methiocarb</i>	5.79	0.13
<i>Propyzamide</i>	5.94	0.10
<i>Fenoxycarb</i>	6.44	0.11
<i>EPTCarbamato</i>	6.45	0.10
<i>Indoxacarb</i>	6.94	0.09

Otra fortaleza a resaltar de estos equipos UPLC es el ahorro en el consumo de solventes, por ejemplo el flujo del método quedó establecido en $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, con un gasto calculado de 4.5 mL de solvente por cada corrida, frente a los 35 mL que un sistema convencional de HPLC gastaría, pues los flujos en HPLC están por general en $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ o mayor a estos niveles [49].

En la figura 15 se observa un cromatograma superpuesto de los catorce carbamatos en estudio y el orden de elución de cada uno. La carbendazim y el pirimicarb presentan mayor señal analítica, mientras el indoxacarb es que el presenta la menor señal analítica.

Cabe mencionar que en la figura 15 se observa picos coeluidos (picos que tienen el mismo o muy cercano tiempo de retención), sin embargo esto no representa inconveniente alguno ya que cada carbamato tiene una masa diferente y son analizados independientemente de acuerdo a esa característica como lo demuestra la figura 16 donde se puede observar un cromatograma independiente por cada uno de los catorce carbamatos que se analizaron.

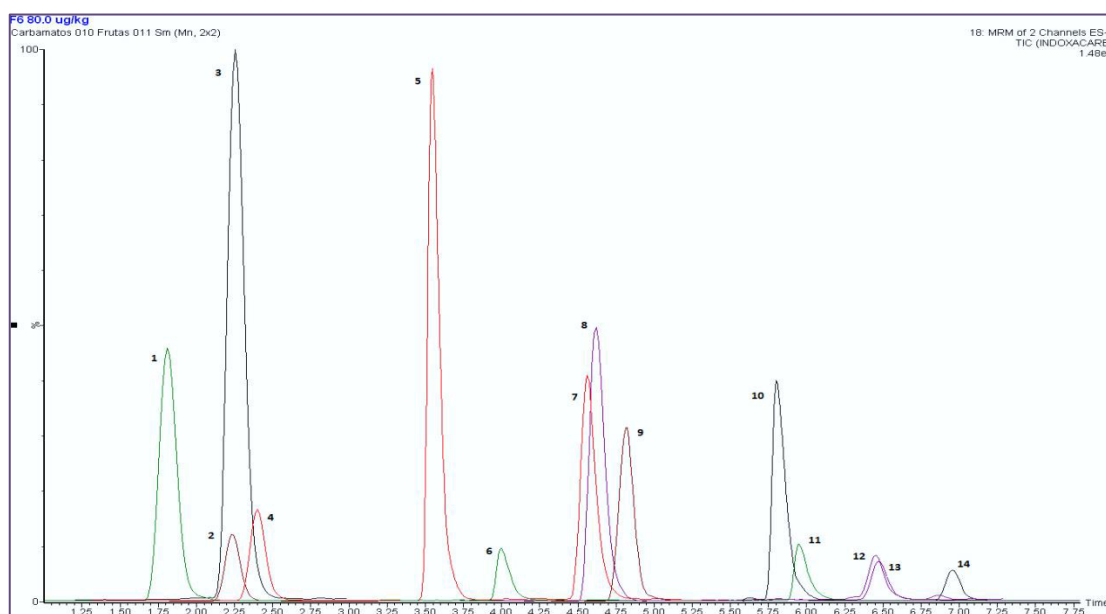


Figura 15. Cromatograma superpuesto de los 14 carbamatos monitoreados. 1. Propamocarb, 2 Oxamyl, 3 Carbendazim, 4. Methomyl, 5 Pirimicarb, 6. Aldicarb, 7. Propoxur, 8. Carbofuran, 9. Carbaryl, 10. Methiocarb, 11. Propyzamide, 12. Fenoxycarb, 13. EPTC, 14. Indoxacarb.

Otra ventaja importante del UPLC es el mejoramiento de la resolución de los picos cromatográficos, como se puede apreciar en la figura 15 y en la 16 los picos presentan una excelente simetría y una estructura gaussiana bien definida.

El volumen de inyección fue de 10 uL, con esto se asegura un mayor aporte de masa de cada analito en la columna y mayor posibilidad de encontrar los analitos en cada corrida.

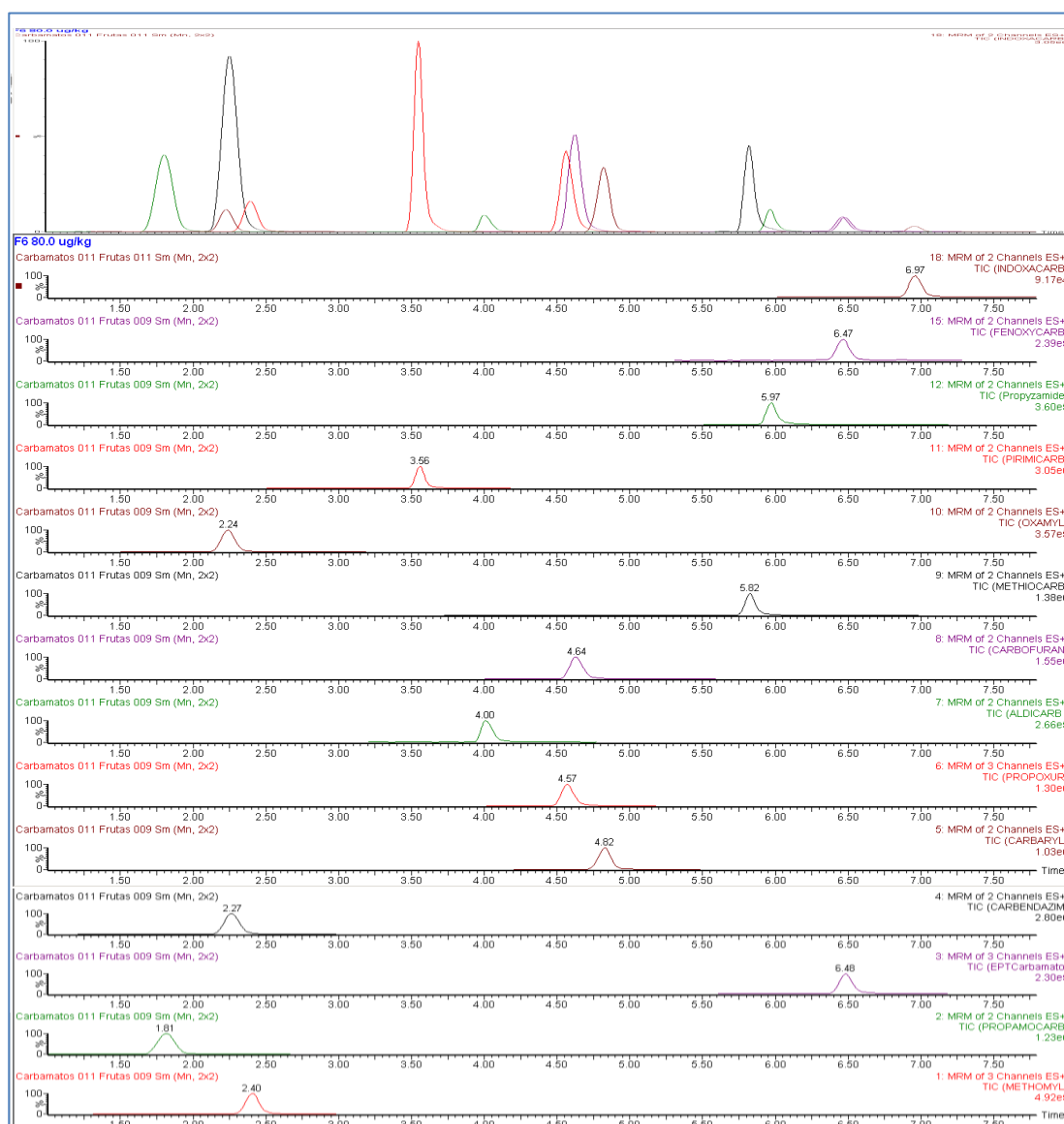


Figura 16. Cromatograma individual de cada carbamato. Con el modo MRM no existe problema con la coelución entre analitos de distintas masas.

4.1.2. Condiciones espectrométricas para la determinación de carbamatos

La ionización por Electrospray, ESI, tiene una notable ventaja con respecto a una de las ionizaciones ampliamente usada en espectrometría de masas como la ionización por impacto de electrones EI. La ventaja radica en que la ESI al ionizar la o las moléculas, provoca poca fragmentación del ion molecular que las ionizaciones obtenidas por EI.

Este proceso logra un aumento de la sensibilidad del equipo y la posibilidad de llegar a niveles mucho más bajos que una fuente de ionización por impacto de electrones.

La polaridad de la ionización ESI quedó establecida en modo positivo, esto debido al carácter básico de las moléculas de los carbamatos.

El voltaje óptimo del capilar se fijó en 0.5 kV, para favorecer la formación del ion molecular. La temperatura de la fuente quedó fijada en 150 °C, la temperatura de desolvatación en 500 °C y el flujo de gas de desolvatación en 800 L.Hr⁻¹. En la figura 17 se observa el proyecto MS TUNE “Carbamatos.ipr” creado para la determinación de carbamatos donde se fijaron todos los parámetros de la fuente de ionización.

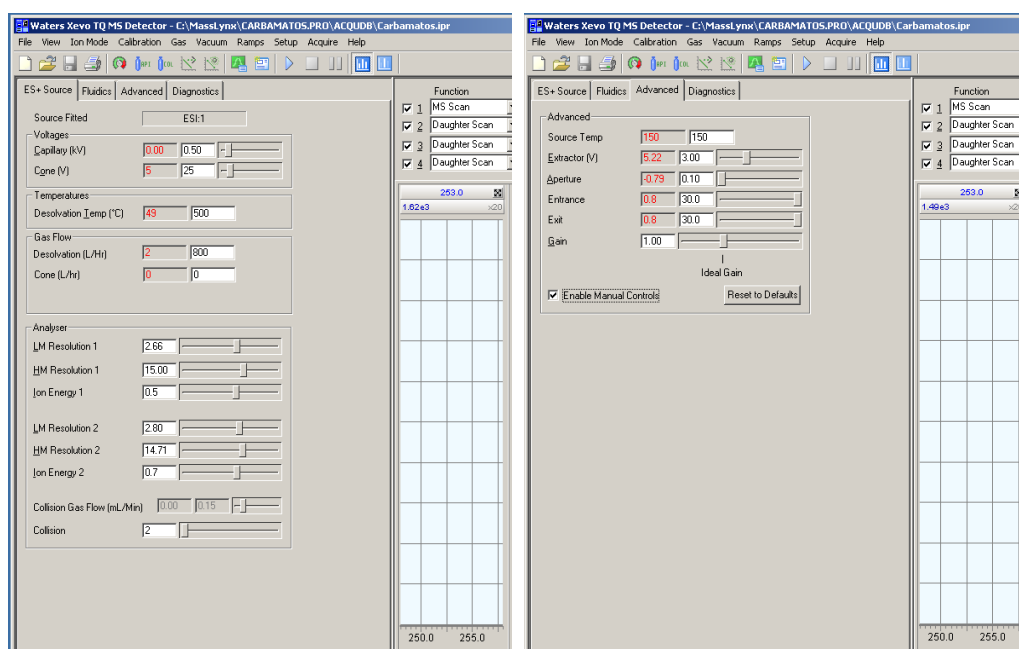


Figura 17. Parámetros de la fuente de ionización señalados en el programa MS tune. Fuente Masslynx Waters.

En la tabla XVI se muestran los valores ajustados y óptimos para la determinación de los carbamatos.

Tabla XVI. Condiciones espectrométricas para determinar carbamatos por ESI LC-MS/MS

Parámetro MS/MS	
Polaridad ESI	Positivo
Voltaje del capilar (kV)	0.5
Voltaje del cono (V)	Ver Tabla XVII
Voltaje del Extractor (V)	3.00
Temperatura de la fuente (°C)	150
Temperatura de desolvatación (°C)	500
Flujo del gas del cono (L/Hr)	Off
Flujo del gas de desolvatación (L/Hr)	800
Flujo del gas de colisión (ml.min ⁻¹)	0.15
LM 1 Resolution	2.7
HM 1 Resolution	15.0
Ion Energy 1	0.5
LM 2 Resolution	2.8
HM 2 Resolution	14.7
Ion Energy 2	0.7
Ganancia	1.00
Fotomultiplicador	517.22

En la tabla XVII se detallan los voltajes de cono y energía de colisión para cada carbamato estudiado.

Tabla XVII. Parámetros de MRM para análisis de carbamatos por MS/MS tomados de la base de datos QUAMPEDIA

Compuesto	Modo de ionización	Ion precursor Q1 (m/z)	Ion fragmento Q3 (m/z)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión
Methomyl	ES+	163.08	88.06	10	8
			106	10	10
			112.03	10	4
Propamocarb	ES+	189.18	102.11	22	18
			144.1	22	12
EPTCarbamato	ES+	190.21	86.05	20	14
			128.11	20	10
			162.13	20	12
Carbendazim	ES+	192.21	132.12	24	28
			160.1	24	18
Carbaryl	ES+	202.11	127.07	16	26
			145.06	16	12
Propoxur	ES+	210.14	92.98	12	24
			111.05	12	14
			168.08	12	8
Aldicarb	ES+	213.1	89.1	19	16
			116.1	19	11
Carbofuran	ES+	222.14	123.08	20	22
			165.12	20	12
Methiocarb	ES+	226.11	121.12	16	18
			169.1	16	10
Oxamyl	ES+	237	72	12	10
			90	12	10
Pirimicarb	ES+	239.18	72.02	28	20
			182.2	28	16
Propyzamide	ES+	256.12	172.99	20	22
			190.05	20	14
Fenoxycarb	ES+	302.16	87.97	20	20
			256.15	20	16
Indoxacarb	ES+	528.17	150.01	28	20
			203.09	28	40

Como explicamos anteriormente la ionización ESI mantiene por lo general como ion precursor al ion molecular. En la tabla XVIII se detallan los pesos moleculares de cada carbamato y su respectivo ion precursor, se puede observar que la mayoría presenta ionización por protonación $[MH]^+$ y que el aldicarb y methomyl sufrieron el acoplamiento de un aducto con la consecuente formación de un ion precursor por encima de su peso molecular. La propyzamide sufrió una pérdida del electrón formando un ion $[M]^+$ con lo cual mantiene intacto su peso molecular.

Tabla XVIII. Peso molecular e ion precursor $[MH]^+$

	Peso molecular g.mol ⁻¹	ESI $[MH]^+$ m/z
<i>Methomyl</i>	162.21	163.08
<i>Propamocarb</i>	188.27	189.18
<i>EPTCarbamato</i>	189.32	190.21
<i>Carbendazim</i>	191.19	192.21
<i>Carbaryl</i>	201.22	202.11
<i>Propoxur</i>	209.24	210.14
<i>Aldicarb</i>	190.26	213.10*
<i>Carbofuran</i>	221.25	222.14
<i>Methiocarb</i>	225.31	226.11
<i>Oxamyl</i>	219.26	237.0*
<i>Pirimicarb</i>	238.29	239.18
<i>Propyzamide</i>	256.13	256.12**
<i>Fenoxycarb</i>	301.34	302.16
<i>Indoxacarb</i>	527.83	528.17

*Formación aducto

** La ionización no fue por protonación sino por pérdida de electron

Los iones precursores que han sido seleccionados son sometidos a una energía de colisión específica en la celda de colisión, para producir los iones hijos. En el presente estudio se seleccionaron los iones hijos con mayor abundancia, tomando como el ion de cuantificación al de mayor abundancia relativa y a o los iones hijos con menor abundancia relativa como los iones de cualificación.

En la figura 18 se puede observar el cromatograma MRM del methomyl al cual se le monitoreo tres iones hijos (122.03, 106.00 y 88.06), la transición que presenta mayor abundancia relativa es la 163.08>88.06 con un valor de

1.01×10^5 , muy por encima de las transiciones $163.08 > 106$ y $163.08 > 122.03$ con abundancias relativas de 9.98×10^4 y 4.00×10^4 respectivamente.

En la tabla XIX se puede observar las transiciones de cada carbamato así como su ion de cuantificación y cualificación seleccionados de acuerdo a su abundancia relativa.

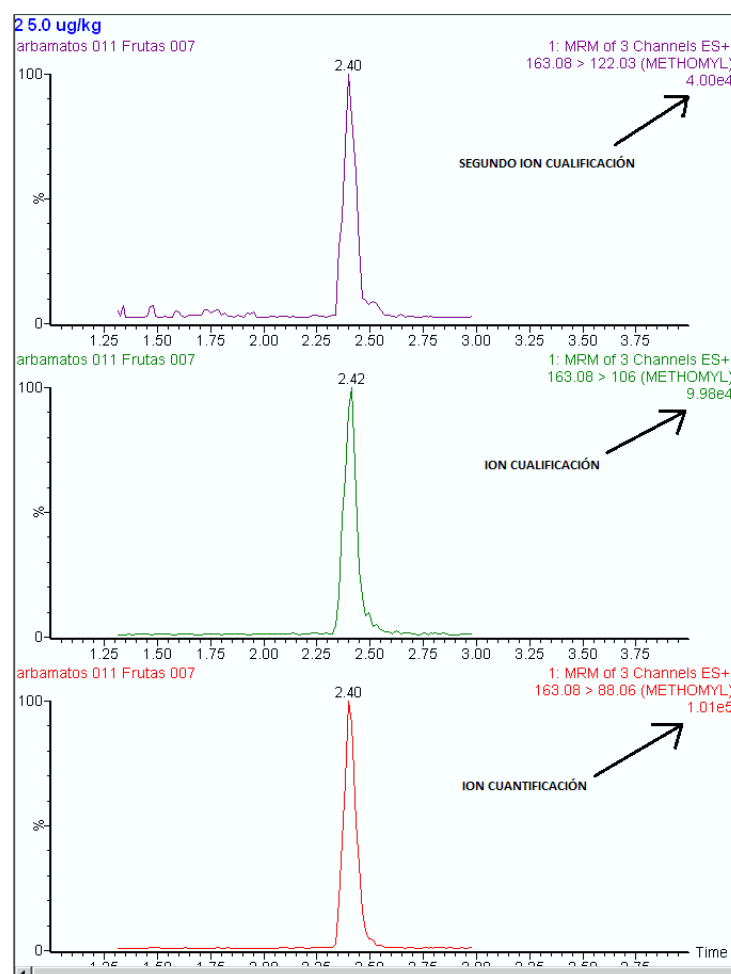


Figura 18. MRM de tres canales para el Methomyl

En la figura 19 se observa el cromatograma del EPTC y del Pirimicarb a una concentración de fortificación en matriz de tomate a 2.5 ug.kg^{-1} , se determinó la señal ruido (S/N) de ambas dando valores S/N por encima de 3. El EPTC tiene, a la concentración de 2.5 ug.kg^{-1} , una S/N de 10, permitiendo poder establecer un límite de cuantificación a ese nivel; para el pirimicarb la S/N a la misma concentración de 2.5 ug.kg^{-1} fue de 384, permitiendo poder bajar los límites de cuantificación a valores muy por debajo de los establecidos en el presente estudio.

Tabla XIX. Transiciones de cuantificación y cualificación de los Carbamatos en estudio

<i>Compuesto</i>	<i>Dwell (s)</i>	<i>Transición de cuantificación (m/z)</i>	<i>Transición de cualificación (m/z)</i>
<i>Propamocarb</i>	<i>0.250</i>	<i>189.18 > 102.11</i>	<i>189.18 > 144.10</i>
<i>Oxamyl</i>	<i>0.075</i>	<i>237.00 > 72.00</i>	<i>237.00 > 90.00</i>
<i>Carbendazim</i>	<i>0.050</i>	<i>192.21 > 160.10</i>	<i>192.21 > 132.12</i>
<i>Methomyl</i>	<i>0.040</i>	<i>163.08 > 88.06</i>	<i>163.08 > 106.00</i>
<i>Pirimicarb</i>	<i>0.100</i>	<i>239.18 > 72.02</i>	<i>239.18 > 182.20</i>
<i>Aldicarb</i>	<i>0.100</i>	<i>213.10 > 89.10</i>	<i>213.10 > 116.10</i>
<i>Propoxur</i>	<i>0.030</i>	<i>210.14 > 111.05</i>	<i>210.14 > 168.08</i>
<i>Carbofuran</i>	<i>0.020</i>	<i>222.14 > 123.08</i>	<i>222.14 > 165.12</i>
<i>Carbaryl</i>	<i>0.100</i>	<i>202.11 > 145.06</i>	<i>202.11 > 127.07</i>
<i>Methiocarb</i>	<i>0.025</i>	<i>226.11 > 169.10</i>	<i>226.11 > 121.12</i>
<i>Propyzamide</i>	<i>0.050</i>	<i>256.12 > 190.05</i>	<i>256.12 > 172.99</i>
<i>Fenoxycarb</i>	<i>0.012</i>	<i>302.16 > 87.97</i>	<i>302.16 > 256.15</i>
<i>EPTCarbamato</i>	<i>0.040</i>	<i>190.21 > 128.11</i>	<i>190.21 > 86.05</i>
<i>Indoxacarb</i>	<i>0.090</i>	<i>528.17 > 203.09</i>	<i>528.17 > 150.01</i>

En la tabla XX se puede observar la S/N de los catorce carbamatos a un spike de 2.5 ug.kg⁻¹. Como se puede apreciar todos los carbamatos presentan valores de S/N muy por encima de 3 (considerado como un nivel mínimo para establecer el LOD), de esta manera se podrá en un futuro bajar los límites de cuantificación de todos los carbamatos ante una posible consideración de autoridades legales de poner más estrictos los LMR ya establecidos a la presente fecha.

Tabla XX. Señal ruido S/N de los Carbamatos a 2.5 ug.kg⁻¹

<i>Compuesto</i>	<i>Señal ruido en matriz tomate 2.5 ug.kg⁻¹</i>
<i>Propamocarb</i>	<i>225.96</i>
<i>Oxamyl</i>	<i>194.41</i>
<i>Carbendazim</i>	<i>167.97</i>
<i>Methomyl</i>	<i>92.52</i>
<i>Pirimicarb</i>	<i>384.14</i>
<i>Aldicarb</i>	<i>29.04</i>
<i>Propoxur</i>	<i>107.79</i>
<i>Carbofuran</i>	<i>117.49</i>
<i>Carbaryl</i>	<i>378.62</i>
<i>Methiocarb</i>	<i>51.32</i>
<i>Propyzamide</i>	<i>58.14</i>
<i>Fenoxycarb</i>	<i>29.72</i>
<i>EPTCarbamato</i>	<i>10.71</i>
<i>Indoxacarb</i>	<i>16.45</i>

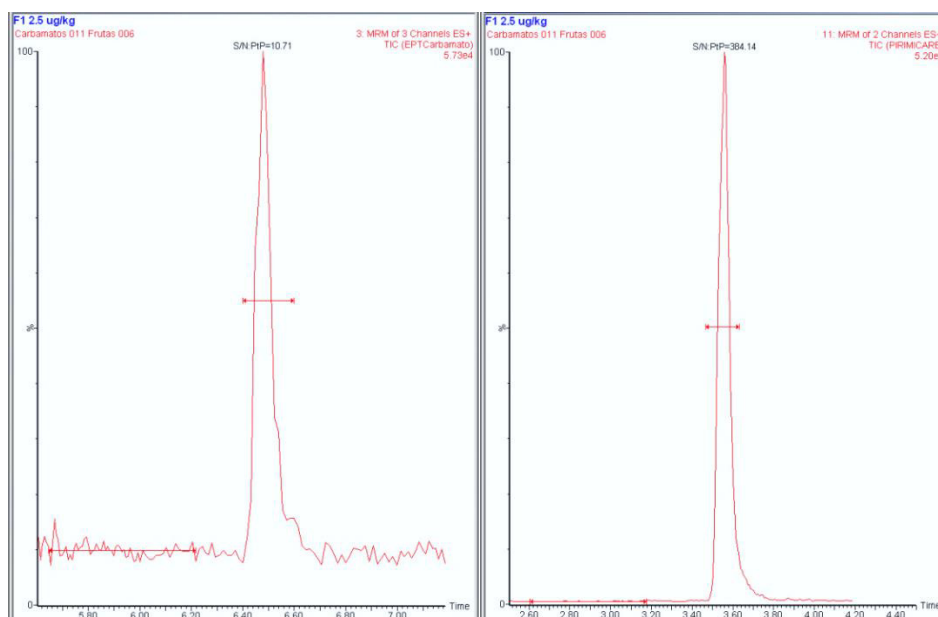


Figura 19. S/N del EPTCarbamato y del Propamocarb

Otro punto importante a considerar en los espectrómetros de masas es la resolución de masas. La resolución es la habilidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre iones de diferente relación m/z . El XEVO TQ MS presenta una muy buena resolución capaz de distinguir iones con un m/z 200.0 y 200.4 como ejemplo.

Una vez ajustados todos los parámetros espectrométricos se procede a crear un método de procesamiento en el programa Targetlynx. Los parámetros necesarios para la creación del método son los siguientes: tiempo de retención del analito; una ventana para el tiempo de retención, por lo general entre un 5 a 10% del tiempo de retención es considerado como óptimo; seleccionar el ion de cuantificación de acuerdo a su abundancia relativa; uno o más iones de cualificación; el tipo de ajuste de curva, para nuestro estudio se seleccionó un ajuste lineal y con ponderación $1/x$ y un valor D-well.

En la tabla XXI se observa el resumen de los datos de los parámetros cromatográficos y espectrométricos para la elaboración del método de procesamiento en el programa Targetlynx.

Tabla XXI. Parámetros considerados para el método de procesamiento de los Carbamatos

Compuesto	Tiempo de retención T_R (min)	Ventana T_R ($\pm$ min)	Dwell (s)	Transición de cuantificación (m/z)	Transición de cualificación (m/z)	Ponderación a la curva de calibrado
Propamocarb	1.82	0.13	0.250	189.18 > 102.11	189.18 > 144.10	1/x
Oxamyl	2.23	0.09	0.075	237.00 > 72.00	237.00 > 90.00	1/x
Carbendazim	2.26	0.12	0.050	192.21 > 160.10	192.21 > 132.12	1/x
Methomyl	2.38	0.09	0.040	163.08 > 88.06	163.08 > 106.00	1/x
Pirimicarb	3.54	0.11	0.100	239.18 > 72.02	239.18 > 182.20	1/x
Aldicarb	3.99	0.10	0.100	213.10 > 89.10	213.10 > 116.10	1/x
Propoxur	4.55	0.09	0.030	210.14 > 111.05	210.14 > 168.08	1/x
Carbofuran	4.60	0.11	0.020	222.14 > 123.08	222.14 > 165.12	1/x
Carbaryl	4.80	0.09	0.100	202.11 > 145.06	202.11 > 127.07	1/x
Methiocarb	5.79	0.13	0.025	226.11 > 169.10	226.11 > 121.12	1/x
Propyzamide	5.94	0.10	0.050	256.12 > 190.05	256.12 > 172.99	1/x
Fenoxycarb	6.44	0.11	0.012	302.16 > 87.97	302.16 > 256.15	1/x
EPTCarbamate	6.45	0.10	0.040	190.21 > 128.11	190.21 > 86.05	1/x
Indoxacarb	6.94	0.09	0.090	528.17 > 203.09	528.17 > 150.01	1/x

4.2. Validación del Método

4.2.1. Selectividad

Para el presente estudio se seleccionaron matrices de tomates riñón orgánicos como blanco matriz, a los cuales primeramente se les realizó un ensayo para comprobar que realmente estén libres de carbamatos, los ensayos dieron resultados negativos para todos los 14 carbamatos, tal como se muestra en la figura 20, cromatograma (a).

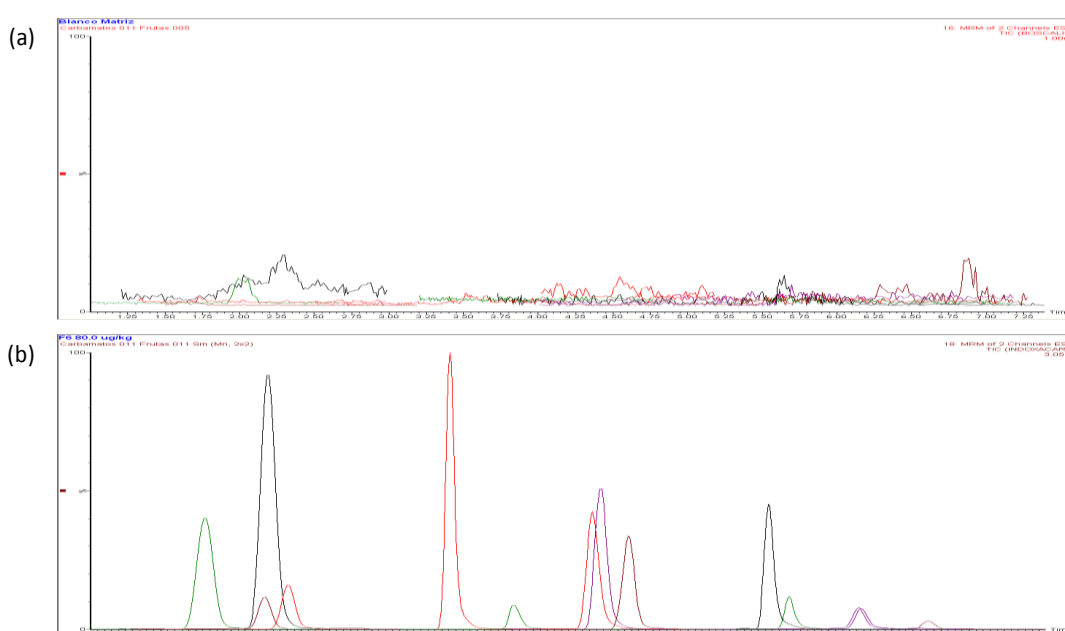


Figura 20. Efecto matriz. En el gráfico (a) se observa un overlay del blanco matriz. En el gráfico (b) se presenta un overlay del blanco matriz fortificado con los 14 carbamatos a un nivel de 5 ug.kg^{-1} .

En la Figura 21 observamos las transiciones de cada uno de los 14 carbamatos en una muestra fortificada a nivel de 5 ug.kg^{-1} , excepto el fenoxicarb donde se fortificó a 10 ug.kg^{-1} , y las transiciones del blanco matriz del tomate riñón orgánico.

La muestra blanco no presenta señal del ion precursor o ion producto en el tiempo de retención establecido para cada carbamato, la línea base es baja y estable en la ventana de lectura. En el Anexo A se detallan las figuras de cada carbamato en su modo MRM con los cromatogramas en su transición de

cuantificación y su transición de cualificación para las muestras blancos y muestras fortificadas respectivamente.

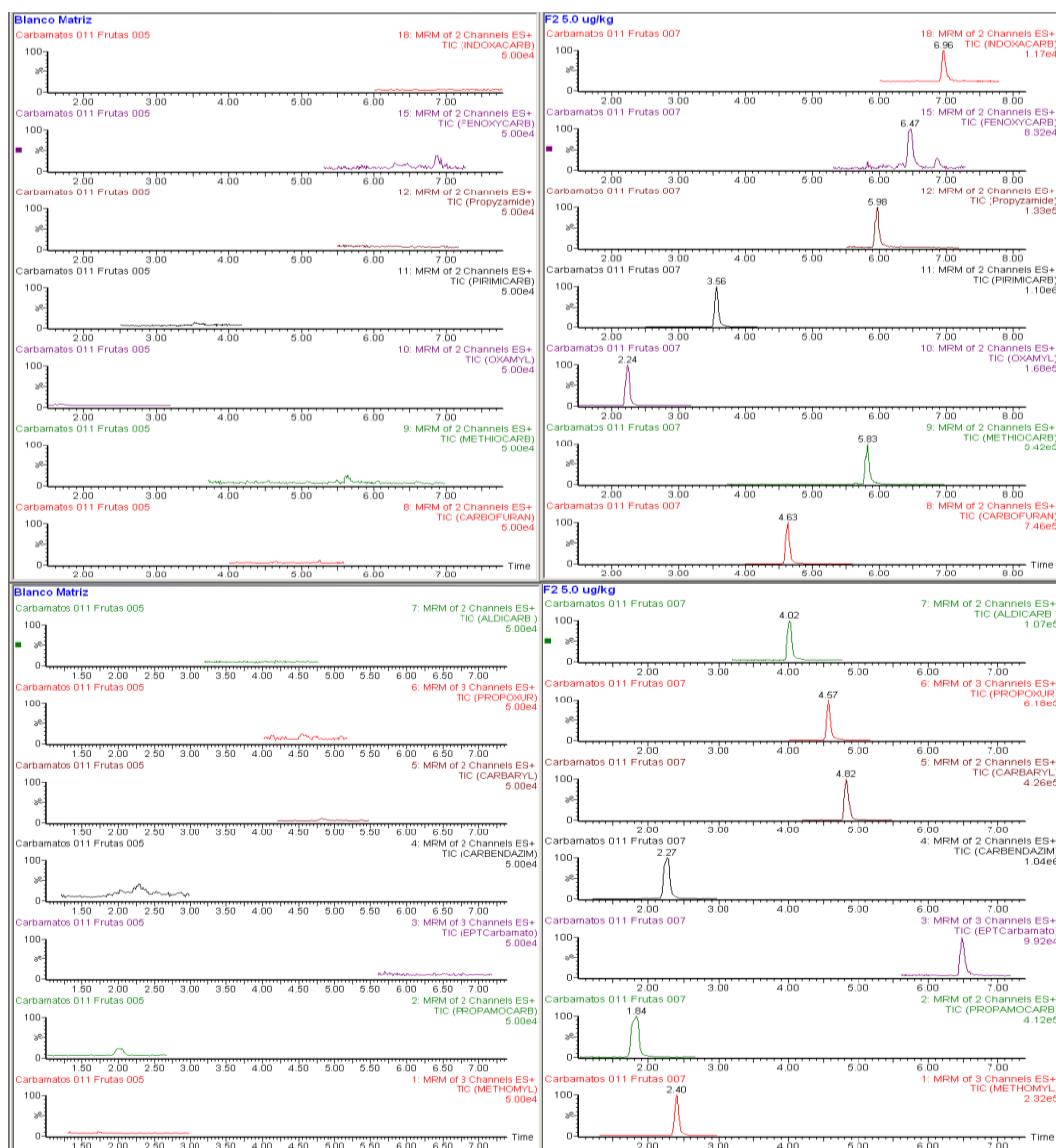


Figura 21. Selectividad. En los cromatogramas de la izquierda están las muestras blancos y en la derecha cada uno de los carbamatos monitoreados

4.2.2. Curva de calibración

Se observó linealidad en el rango de trabajo establecido para todos los 14 carbamatos. El coeficiente de correlación cuadrático mínimo entre todas las curvas de calibrado de todos los carbamatos estudiados fue de 0.9910. Los cálculos de linealidad fueron calculados con el programa

Targetlynx del Software Masslynx V4.1 SCN810 Waters inc. Para validar los resultados obtenidos por el Targetlynx se procedió a calcularlos nuevamente pero con un software diferente, en este caso con el Statgraphics centurión XVI.I. Obteniendo valores similares y validando los cálculos de Targetlynx.

Se realizó una regresión ponderada $1/x$ para el ajuste de la curva de calibrado, logrando con esto pesos similares a cada punto de la curva de calibrado. La tabla XXI muestra el coeficiente de correlación y coeficiente de determinación mínimo para cada carbamato; el promedio de la pendiente e intercepto de cada carbamato de acuerdo a los resultados generales de la validación y el error tipo promedio de las tres curvas de calibración ensayadas durante la validación.

Las figuras del anexo B muestran la curva de calibrado de cada una de los catorce carbamatos estudiados y en los informes de validación del anexo C muestras los intervalos de confianza para la pendiente y el intercepto para cada uno de los 14 carbamatos.

Tabla XXII. Parámetros de curva de calibración

	<i>Datos de calibración</i>				
	<i>Pendiente</i>	<i>Intercepto</i>	<i>R</i>	<i>R²</i>	<i>Sy/x</i>
<i>Methomyl</i>	1026.90	400.19	0.9986	0.9971	535.04
<i>Propamocarb</i>	6516.70	2118.67	0.9991	0.9983	1127.17
<i>EPTCarbamato</i>	681.49	220.23	0.9989	0.9979	615.5
<i>Carbendazim</i>	14685.07	8985.54	0.9992	0.9984	2277.3
<i>Carbaryl</i>	3476.45	1510.90	0.9991	0.9981	2979.44
<i>Propoxur</i>	2793.57	863.73	0.9994	0.9988	1282.97
<i>Aldicarb</i>	912.47	403.37	0.9991	0.9982	725.05
<i>Carbofuran</i>	3634.21	1378.10	0.9973	0.9946	3331.98
<i>Methiocarb</i>	2860.25	1142.33	0.9992	0.9984	2813.84
<i>Oxamyl</i>	1330.92	559.57	0.9989	0.9979	293.05
<i>Pirimicarb</i>	7368.34	2702.63	0.9987	0.9974	1783.03
<i>Propyzamide</i>	832.46	198.35	0.9993	0.9986	881.02
<i>Fenoxycarb</i>	1045.48	398.86	0.9973	0.9946	1449.03
<i>Indoxacarb</i>	48.35	21.05	0.9955	0.9910	66.2

R: Coeficiente de correlación

R²: Coeficiente de determinación

Sy/x: Error estándar residual

En las figuras 22 al 35 se presentan la relación de los residuos estandarizados para cada nivel de concentración de la curva de calibrado, se puede apreciar que existe homoscedasticidad en los carbamatos carbendazim, oxamyl, pirimicarb, propamocarb y propoxur. Mientras que en los carbamatos aldicarb, carbaryl, carbofuran, EPTC, fenoxicarb, indoxacarb, methiocarb, methomyl y propizamide el error aumenta de acuerdo al aumento de su concentración. Y de acuerdo a las figuras del ajuste promedio de las curvas de calibrado se observa que la carbendazim, oxamyl, pirimicarb, propamocarb y propoxur presentan mayor estabilidad durante el proceso de validación. El factor analista influye de manera importante en la construcción de la curva de calibrado, una de tres curvas presenta una pendiente un poco alejada de las otras dos, durante la validación se utilizó un segundo analista para medir la reproducibilidad intermedia. Los intervalos de confianza y predicción son más amplios para los carbamatos aldicarb, carbaryl, carbofuran, EPTC, fenoxicarb, indoxacarb, methiocarb, methomyl y propizamide debido a su alta variación al cambio de analista durante la validación.

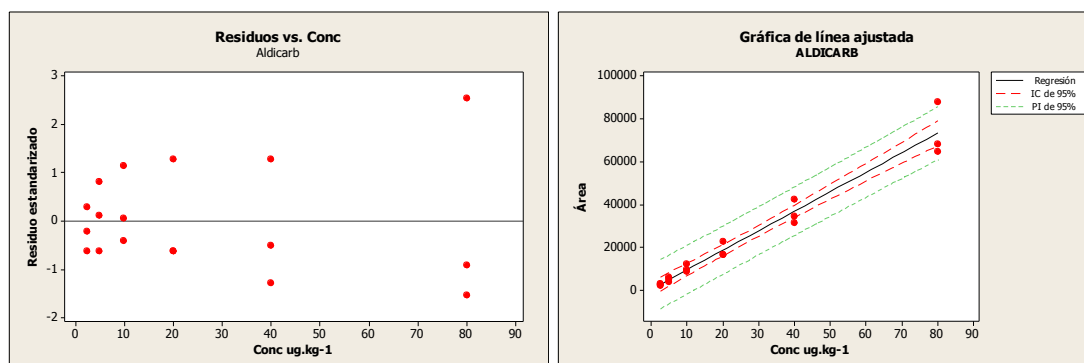


Figura 22. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Aldicarb.

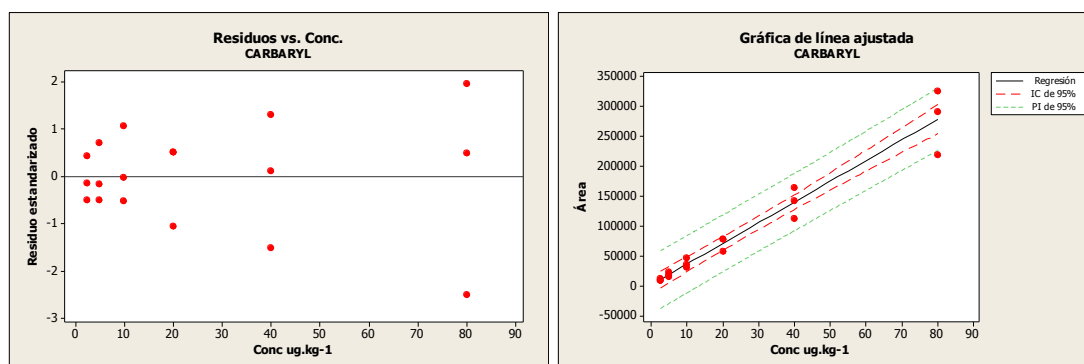


Figura 23. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbaryl.

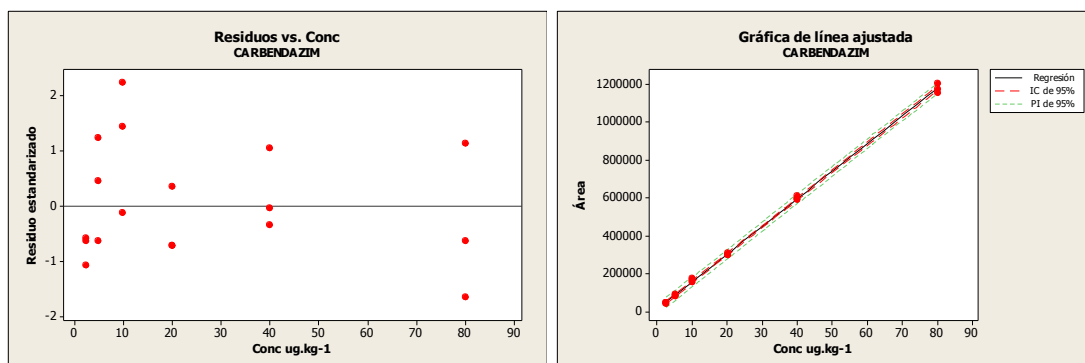


Figura 24. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbendazim.

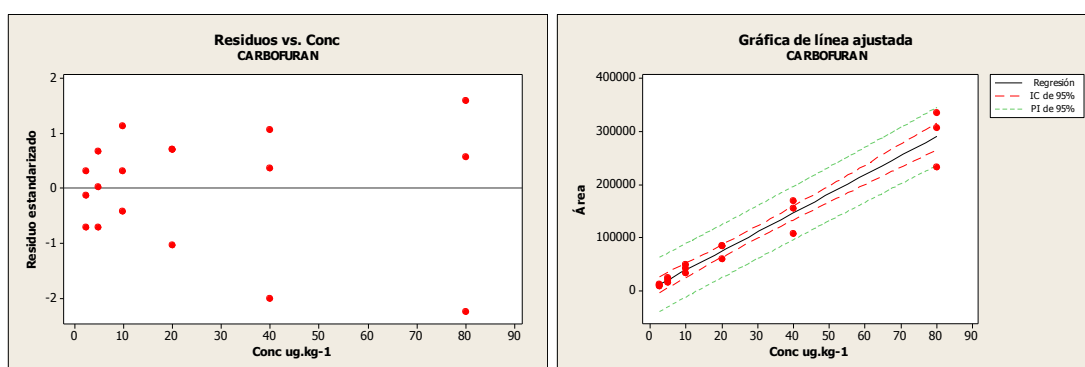


Figura 25. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Carbofuran.

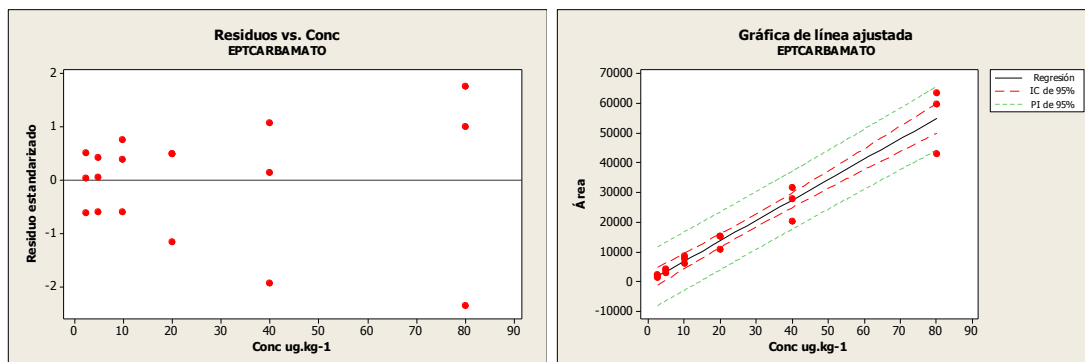


Figura 26. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el EPTC.

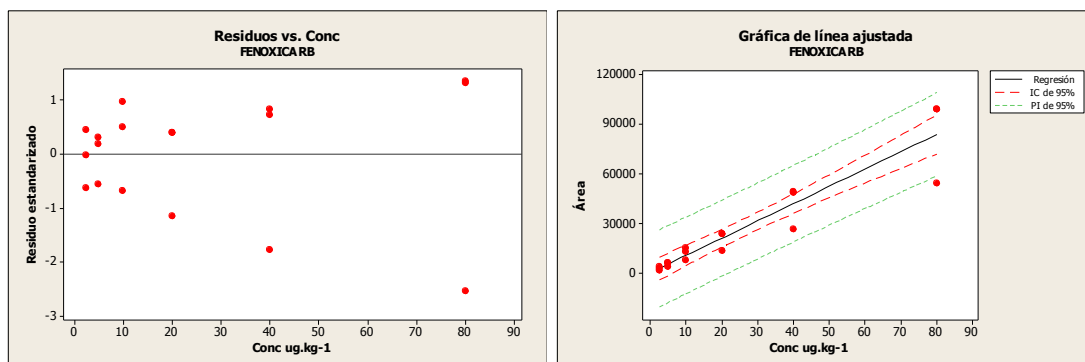


Figura 27. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Fenoxicarb.

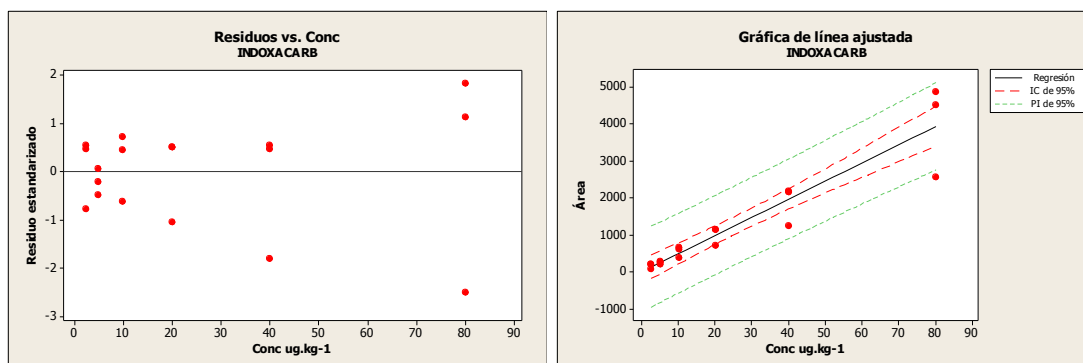


Figura 28. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Indoxacarb.

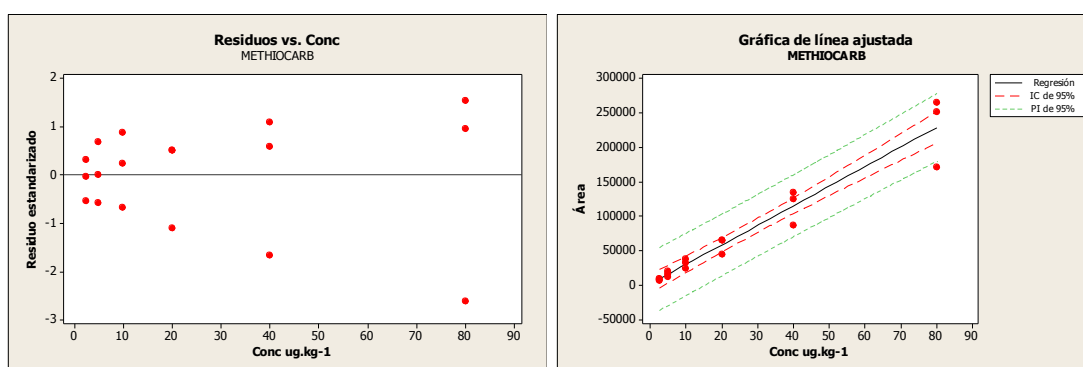


Figura 29. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Methiocarb.

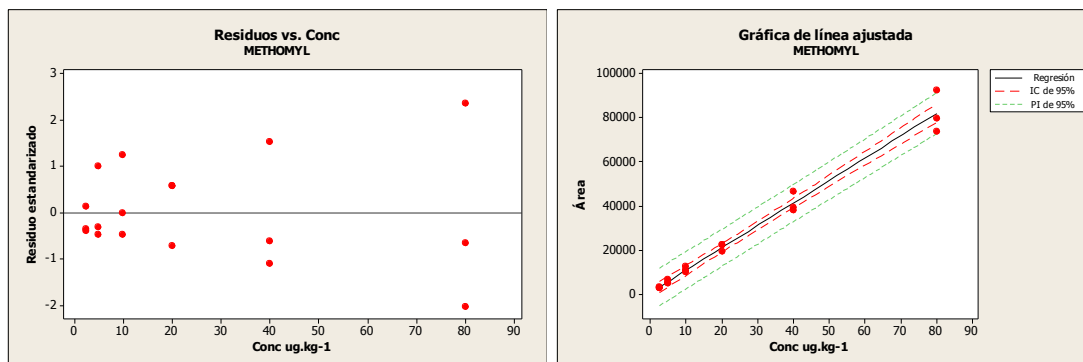


Figura 30. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Methomyl.

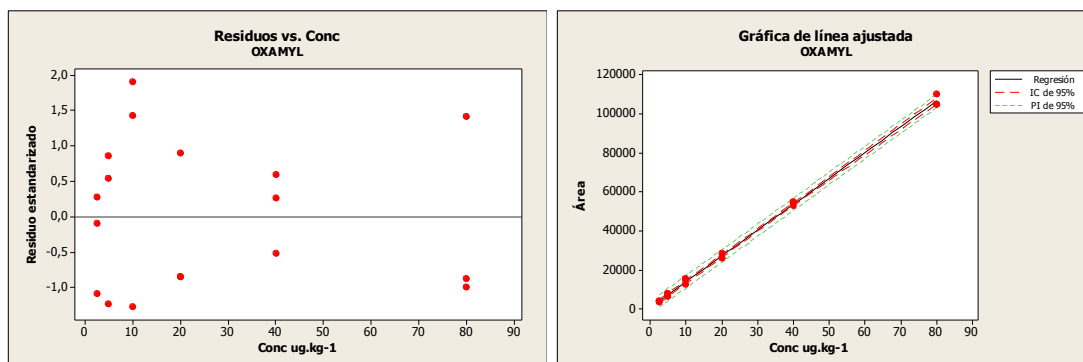


Figura 31. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Oxamyl.

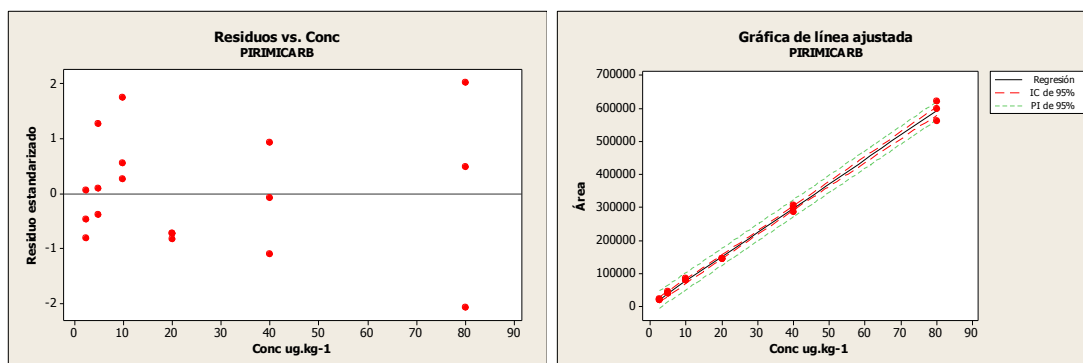


Figura 32. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Pirimicarb.

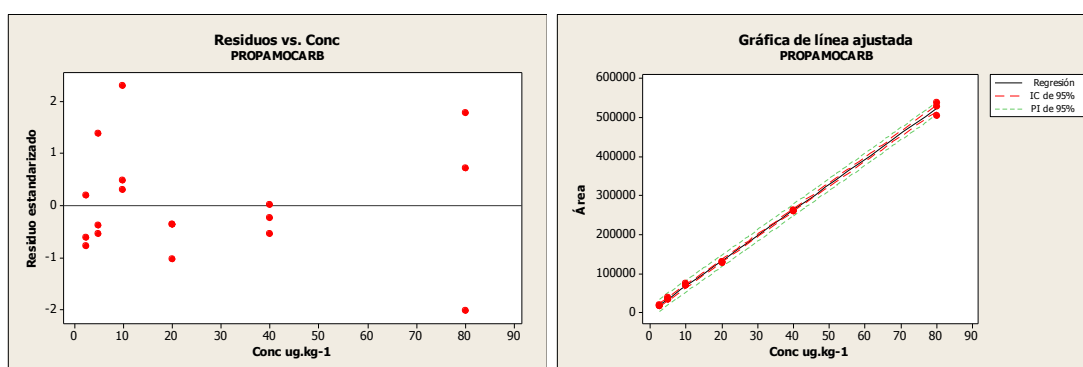


Figura 33. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propamocarb.

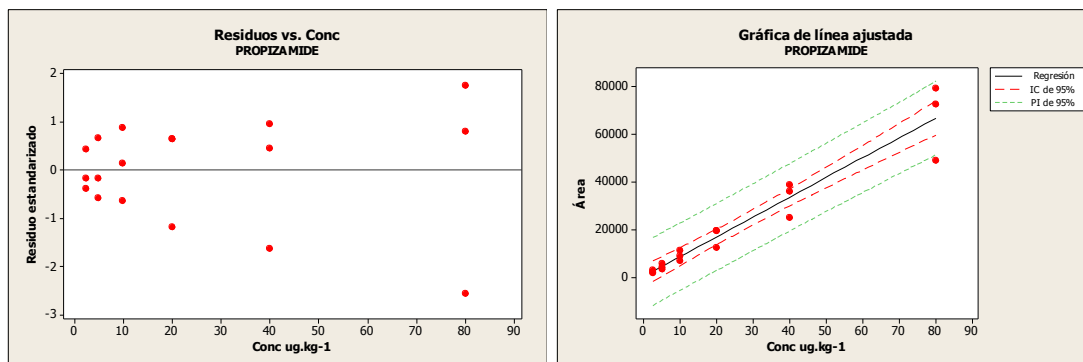


Figura 34. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propyzamide.

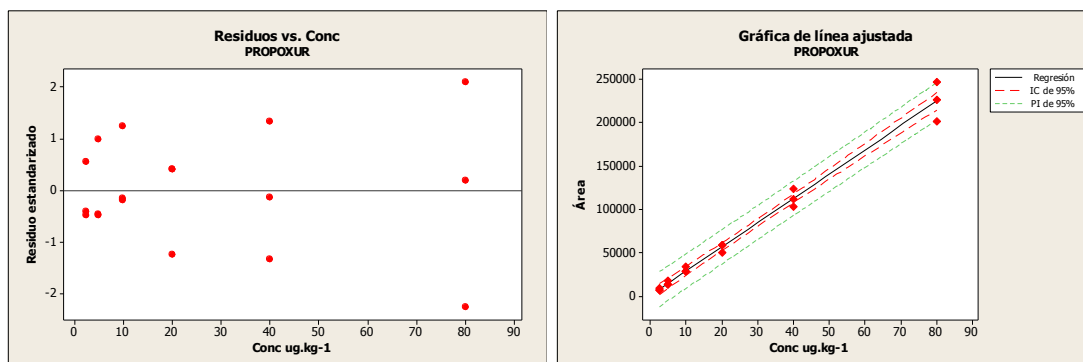


Figura 35. Residuos estandarizados para cada punto de la curva de calibrado e intervalos de confianza y predicción para el Propoxur.

4.2.3. Límite de detección

El límite de detección se obtuvo mediante la ecuación lineal sumando el valor del intercepto promedio de las curvas realizadas, más tres veces la desviación estándar residual. En la Tabla XXIII se puede observar el valor calculado de cada carbamato, los cuales se encuentran por debajo del LOQ establecido de 5 ug.kg^{-1} .

Tabla XXIII. Límite de Detección LOD

<i>Carbamato</i>	<i>LOD (ug.kg^{-1})</i>
<i>Methomyl</i>	1.56
<i>Propamocarb</i>	0.52
<i>EPTCarbamato</i>	2.71
<i>Carbendazim</i>	0.47
<i>Carbaryl</i>	2.57
<i>Propoxur</i>	1.38
<i>Aldicarb</i>	2.38
<i>Carbofuran</i>	2.75
<i>Methiocarb</i>	2.95
<i>Oxamyl</i>	0.66
<i>Pirimicarb</i>	0.73
<i>Propyzamide</i>	3.17
<i>Fenoxycarb</i>	4.16
<i>Indoxacarb</i>	4.11

4.2.4. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación fue establecido al nivel de 5 ug.kg^{-1} , este valor está por debajo de Límites Máximos Residuales de todos los 14 carbamatos del presente estudio. La precisión y la recuperación fueron acordes a los objetivos de validación. Los resultados en la recuperación se encuentran en un rango de 96.9 a 104.9 %. Mientras que los resultados de precisión todos están por debajo del 20 % RSD. En la Tabla XXIV se muestra los valores de recuperación y precisión a nivel de 5 ug.kg^{-1} de los tres días de validación.

Tabla XXIV. Precisión y recuperación al nivel del LOQ.

	5 ug.Kg ⁻¹		
	% Recuperación (n=18)	% RSD _r * (n=18)	% RSD _R ** (n=18)
Methomyl	102.5	2.98	3.23
Propamocarb	102.5	2.06	3.10
EPTCarbamato	96.9	4.90	4.91
Carbendazim	102.2	2.23	2.99
Carbaryl	100.9	1.99	2.68
Propoxur	103.7	3.67	4.58
Aldicarb	104.9	3.38	4.19
Carbofuran	102.9	3.84	5.73
Methiocarb	101.2	3.56	3.56
Oxamyl	102.7	3.44	4.10
Pirimicarb	102.2	2.40	2.53
Propyzamide	101.4	3.41	4.40
Fenoxycarb	101.8	6.27	6.27
Indoxacarb	104.7	15.1	17.71

* Desviación estándar relativa por repetibilidad

** Desviación estándar relativa por reproducibilidad intermedia

4.2.5. Precisión

La precisión describe la cercanía de las medidas individuales de un analito. Cuando el procedimiento se repite bajo condiciones constantes se denomina repetibilidad, o en condiciones diferentes como distintos analistas, distintos lotes de reactivos, lapsos largos de tiempo, diferentes laboratorios, se denomina reproducibilidad. Como el ensayo de reproducibilidad no se la realizó con otro laboratorio, pero si cambiando de analista y de tiempo de análisis (días) se tomó como la reproducibilidad la reproducibilidad intralaboratorio o intermedia.

La Tabla XXV muestra los valores obtenidos de precisión de acuerdo a cada nivel estudiado. Los datos muestran que el método es estable y preciso, con una desviación estándar relativa o también denominado coeficiente de variación muy por debajo de lo permitido por las normas europeas, de hasta 20% RSD. Inclusive el método presenta robustez al realizarlo en diferentes

días y con diferentes analistas, pues los resultados de reproducibilidad intermedia no están muy alejados de los valores obtenidos por repetibilidad.

Tabla XXV. Precisión en términos de RSD_r y RSD_R obtenidos en la validación.

	5 ug.Kg ⁻¹		10 ug.kg ⁻¹		15 ug.kg ⁻¹	
	% RSD_r *	% RSD_R **	% RSD_r	% RSD_R	% RSD_r	% RSD_R
	(n=18)	(n=18)	(n=18)	(n=18)	(n=18)	(n=18)
Methomyl	2.98	3.23	3.32	3.32	4.48	4.59
Propamocarb	2.06	3.10	1.63	4.35	3.05	4.70
EPTCarbamato	4.90	4.91	3.87	5.61	4.19	4.19
Carbendazim	2.23	2.99	2.15	3.21	12.18	12.97
Carbaryl	1.99	2.68	2.28	3.51	2.79	3.29
Propoxur	3.67	4.58	1.48	2.53	2.67	2.67
Aldicarb	3.38	4.19	2.10	5.58	3.13	4.52
Carbofuran	3.84	5.73	2.24	5.92	4.38	4.38
Methiocarb	3.56	3.56	2.68	2.75	2.58	2.76
Oxamyl	3.44	4.10	2.33	3.05	3.22	4.91
Pirimicarb	2.40	2.53	1.76	2.96	2.81	3.83
Propyzamide	3.41	4.40	3.56	3.56	2.78	2.78
Fenoxycarb	6.27	6.27	6.05	9.98	6.35	6.35
Indoxacarb	15.1	17.71	9.03	14.23	6.70	9.46

* Desviación estándar relativa por repetibilidad

** Desviación estándar relativa por reproducibilidad intermedia

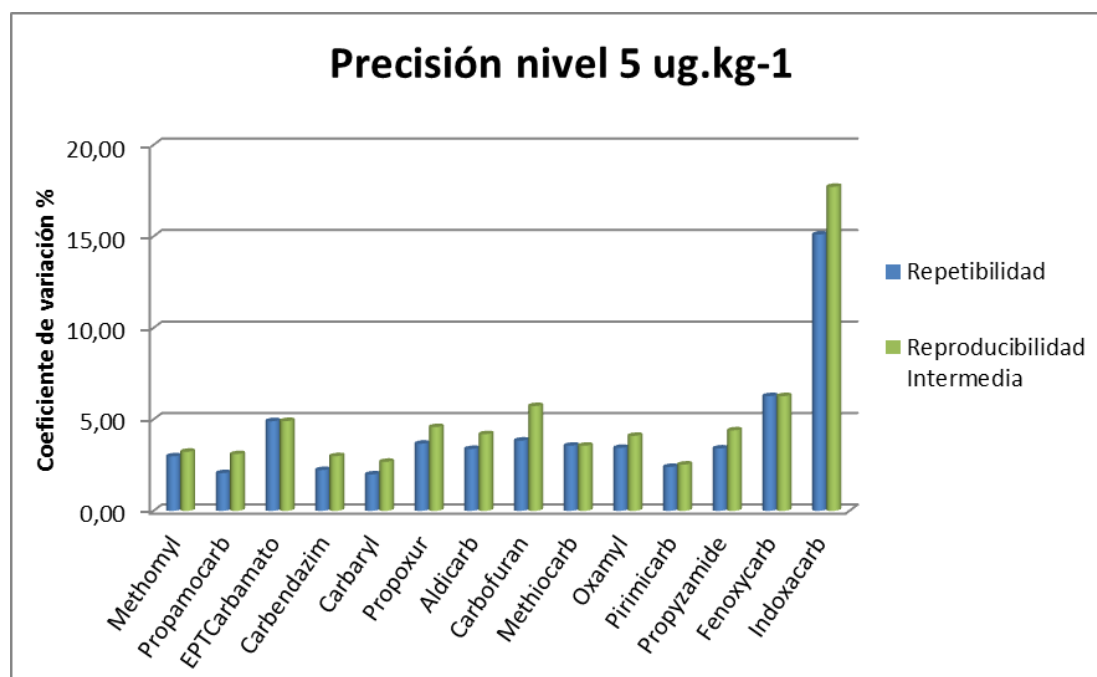


Gráfico 3. Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 5 ug.kg⁻¹

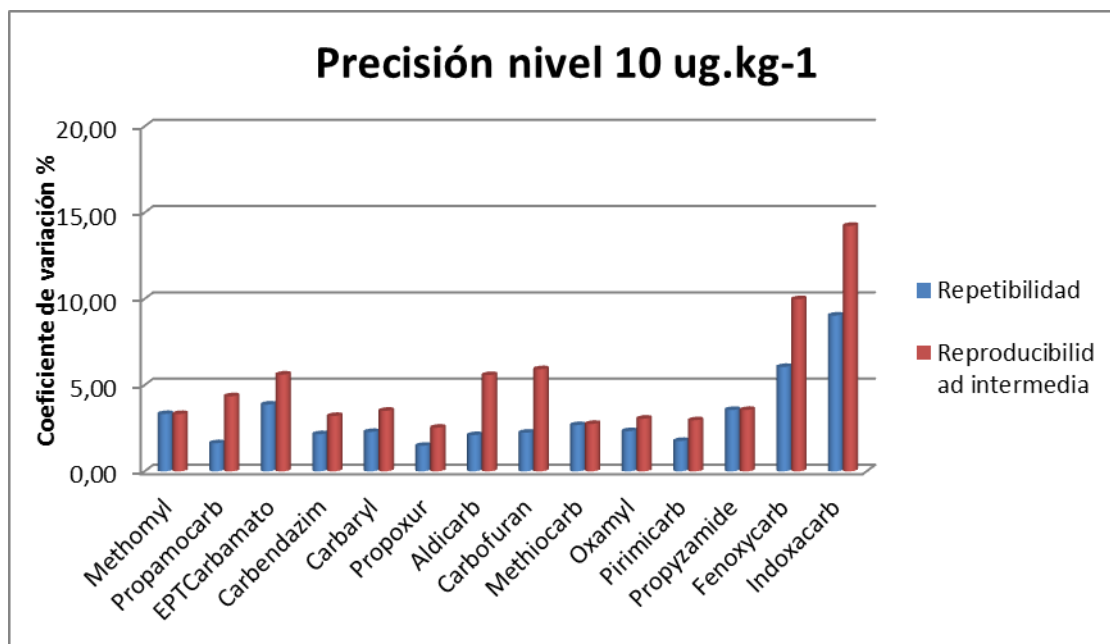


Gráfico 4. Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 10 ug.kg⁻¹

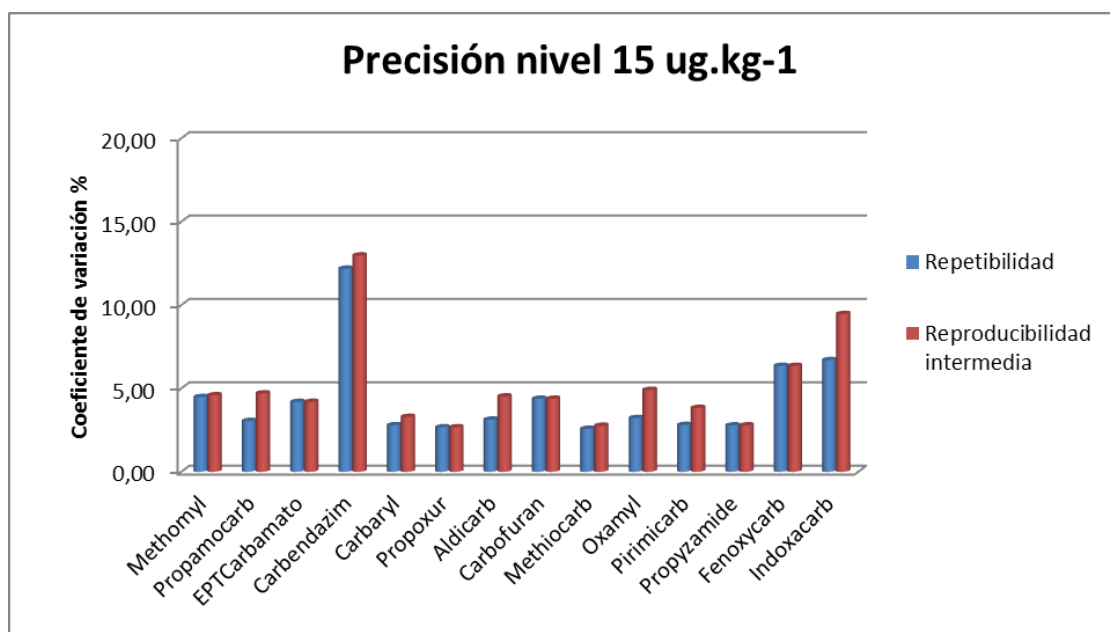


Gráfico 5. Precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad intermedia al nivel de fortificación de 15 ug.kg⁻¹

En los gráficos 3, 4 y 5 se puede observar las cercanías de los valores de repetibilidad con la reproducibilidad intermedia, demostrando que el cambio de analista y lotes de reactivos no representa cambios sustanciales en la precisión del método.

4.2.6 Recuperación

La veracidad fue analizada en términos de recuperación, ya que no se contó con un Material de Referencia Certificado, MRC. La recuperación es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico. En la Tabla XXVI se observa la recuperación media por cada nivel validado, obteniendo resultados que se enmarcan en el rango de trabajo establecido para un buen porcentaje de recuperación, los valores obtenidos de recuperación van de 96.9 a 104.9 % para el nivel de 5 ug.kg⁻¹; de 104.4 a 111.0 % para el nivel de 10 ug.kg⁻¹ y de 103.5 a 113.4 % para el nivel de 15 ug.kg⁻¹.

En este punto se debe mencionar las ventajas que presenta la metodología QUECHERS en la extracción de los carbamatos en la matriz del tomate riñón, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la recuperación y la repetibilidad muestran que la metodología QUECHERS es robusta y con un alto grado de confiabilidad.

Los informes de validación para cada carbamato se detallan en el Anexo C, con los resultados de los parámetros fijados y rangos de incertidumbre hallados.

Tabla XXVI. Porcentajes de recuperación obtenidos en la validación.

	5 ug.Kg ⁻¹	10 ug.kg ⁻¹	15 ug.kg ⁻¹
	% Recuperación (n=18)	% Recuperación (n=18)	% Recuperación (n=18)
Methomyl	102.5	108.5	110.7
Propamocarb	102.5	106.8	108.68
EPTCarbamato	96.9	104.4	105.6
Carbendazim	102.2	108.2	113.1
Carbaryl	100.9	105.3	108.1
Propoxur	103.7	109.5	112.4
Aldicarb	104.9	111.0	113.4
Carbofuran	102.9	109.9	109.0
Methiocarb	101.2	105.5	108.8
Oxamyl	102.7	108.4	112.2
Pirimicarb	102.2	107.2	109.0
Propyzamide	101.4	105.2	107.5
Fenoxycarb	101.8	104.4	103.5
Indoxacarb	104.7	106.7	108.5

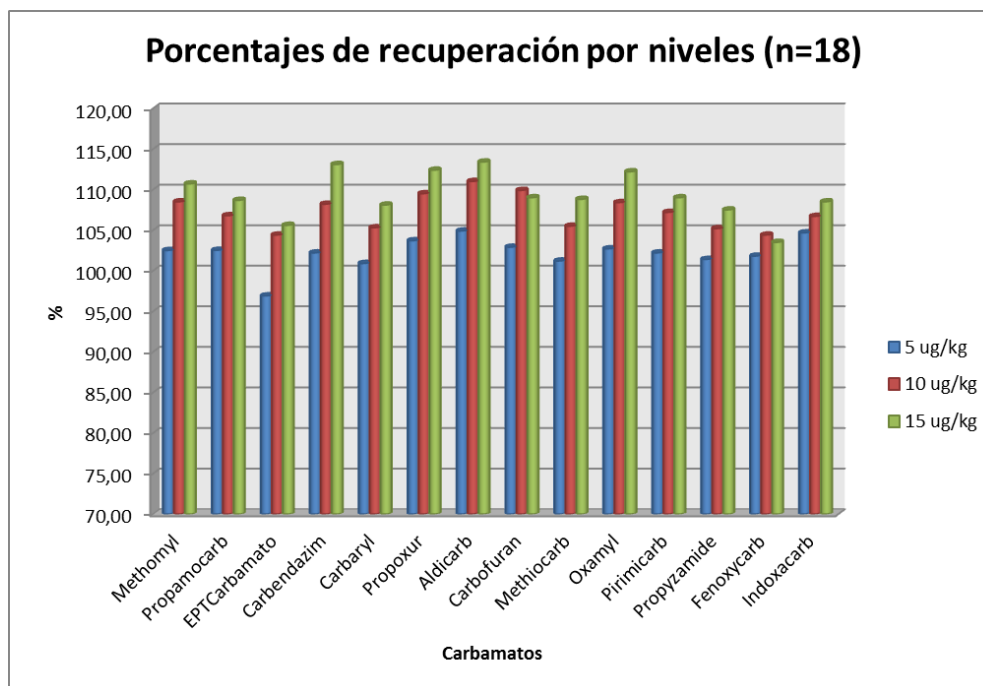


Gráfico 6. Porcentajes de recuperación por niveles de fortificación

En el gráfico 6 se observa que los porcentajes de recuperación para los tres niveles validados de todos los carbamatos están por encima al 100%, exceptuando al primer nivel del EPTC que se encuentra por debajo del 100%.

4.2.7. Incertidumbre en la medida

Las fuentes de incertidumbre que se consideraron en el siguiente método se enumeran a continuación:

- Incertidumbre por pesada en la balanza: ± 0.16 mg
- Incertidumbre por la pureza del estándar: $\pm 0,5$ % para todos los estándares.
- Incertidumbre por reproducibilidad, ver tabla XXVII
- Incertidumbre de la curva de calibrado, ver tabla XXVII
- Incertidumbre de la pipeta automática: ± 0.48 uL
- Incertidumbre del dispensador: ± 0.018 mL

De las arriba mencionadas las que presentan mayor contribución a la incertidumbre total del método son la incertidumbre por reproducibilidad y la

incertidumbre por la curva de calibrado. En el gráfico 7 se puede observar la contribución de cada fuente de incertidumbre por cada nivel ensayado.

En la tabla XXVII se observa los valores de la contribución de las incertidumbres tipo A y B por nivel, los únicos datos que varían en cada nivel son las incertidumbre por reproducibilidad y por curva de calibrado las cuales disminuyen a medida que aumenta la concentración.

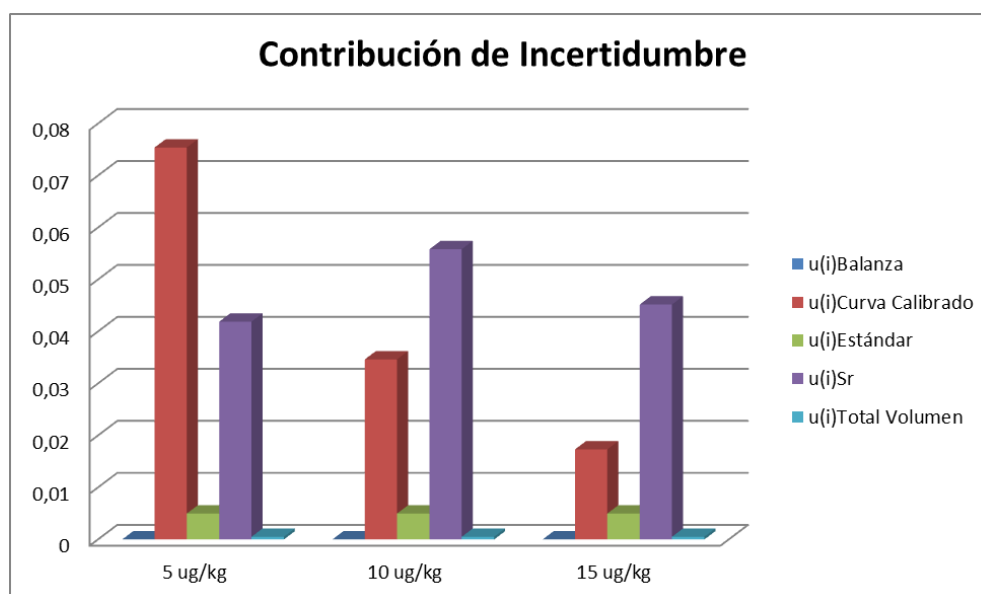


Gráfico 7. Contribuciones a la Incertidumbre total del método.

Tabla XXVII. Fuentes de incertidumbre y su contribución a la incertidumbre total del método

	U Curva calibrado			U Balanza	U Pureza Std	U Dispensador	U Pipeta	U Reproducibilidad		
	5 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹					5 mg.kg ⁻¹	10 mg.kg ⁻¹	15 mg.kg ⁻¹
Methomyl	0.19	0.18	0.17	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.17	0.36	0.76
Propamocarb	0.28	0.26	0.25	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.16	0.46	0.77
EPTCarbamato	0.58	0.55	0.52	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.24	0.59	0.66
Carbendazim	0.25	0.24	0.23	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.15	0.35	2.20
Carbaryl	0.16	0.15	0.15	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.13	0.37	0.53
Propoxur	0.18	0.18	0.17	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.24	0.28	0.45
Aldicarb	0.39	0.37	0.35	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.22	0.62	0.77
Carbofuran	0.51	0.48	0.46	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.29	0.65	0.72
Methiocarb	0.17	0.16	0.15	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.18	0.29	0.45
Oxamyl	0.20	0.19	0.18	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.21	0.33	0.83
Pinimicarb	0.38	0.36	0.34	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.13	0.32	0.63
Propyzamide	0.21	0.20	0.19	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.22	0.38	0.45
Fenoxycarb	0.54	0.51	0.49	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.32	1.04	0.99
Indoxacarb	0.97	0.91	0.87	± 0.16 mg	± 0.5 %	± 0.018 ml	± 0.48 uL	0.93	1.52	1.54

4.3. Resultados de los tomates muestreados

Durante todo el estudio se realizaron 4 diferentes tomas de muestras a cada punto de referencia con un lapso de una semana entre cada toma, en total se obtuvieron 40 muestras durante el lapso del muestreo.

El primer muestreo fue realizado la noche del 3 de Noviembre del 2012 a los supermercados y la mañana del 4 de Noviembre del 2012 a los mercados; todas las muestras fueron procesadas y analizadas el día 4 de Noviembre del 2012. Los siguientes muestreos fueron realizados bajo el mismo esquema en los días 10 y 11; 17 y 18; 24 y 25 de noviembre del 2012.

De los 14 carbamatos monitoreados 7 dieron resultados por debajo del límite de detección, estos son: EPTCarbamato, Propoxur, Aldicarb, Carbofuran, Methiocarb, Propyzamide y Fenoxycarb. El Pirimicarb, Oxamyl y Carbaryl mostraron presencia pero a un nivel menor al límite de cuantificación establecido. De los Carbamatos que dieron resultados por encima del LOQ en las muestras de tomate están el Methomyl, Propamocarb, Carbendazim e Indoxacarb. Los resultados de los Carbamatos que dieron positivo son mostrados en la Tabla XXIX.

El carbamato con mayor recurrencia en las muestras analizadas fue la carbendazim con un 50 % de resultados positivos, seguido del propamocarb y carbaryl con un 20 % de muestras con resultados positivos y en tercer lugar al indoxacarb y pirimicarb con un 17.5 % de muestras con resultados positivos, estos datos son presentados en la tabla XXIX.

Tabla XXIX. Porcentaje de muestras detectadas en el estudio

Muestra	Carbamato	No. de muestras analizadas		
		Analizadas	Detectadas	% Positivo
Tomate	Propamocarb	40	8	20.0
	Oxamyl	40	2	5.0
	Carbendazim	40	20	50.0
	Methomyl	40	6	15.0
	Pirimicarb	40	7	17.5
	Aldicarb	40	0	0.0
	Propoxur	40	0	0.0
	Carbofuran	40	0	0.0
	Carbaryl	40	8	20.0
	Methiocarb	40	0	0.0
	Propyzamide	40	0	0.0
	Fenoxycarb	40	0	0.0
	EPTCarbamato	40	0	0.0
	Indoxacarb	40	7	17.5

Tabla XXVIII. Resultados carbamatos que dieron resultado positivo en ug.kg⁻¹ obtenidos en los puntos de muestros de acuerdo al diseño experimental.

	Mercado 1	Mercado 2	Mercado 3	Mercado 4	Mercado 5	Mercado 6	Supermercado 1	Supermercado 2	Supermercado 3	Supermercado 4
<i>Methomyl</i>	ND	ND	ND	ND	ND	5.10	ND	ND	107.27	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14.86	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	87.42	< LOQ
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.42	ND
<i>Propamocarb</i>	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	104.84	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	< LOQ	10.58	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	159.27	ND	80.17	12.15	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	10.76
<i>Carbendazim</i>	< LOQ	29.77	ND	33.59	ND	11.99	6.04	ND	41.63	ND
	ND	26.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND
	ND	< LOQ	8.40	ND	ND	ND	20.85	ND	58.11	18.01
	89.52	10.14	ND	ND	ND	46.51	8.84	8.28	87.73	58.10
<i>Carbaryl</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Oxamyl</i>	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Pirimicarb</i>	ND	ND	ND	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Indoxacarb</i>	ND	ND	7.94	ND	ND	17.14	ND	ND	ND	< LOQ
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	7.51	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	28.32	ND	ND
	ND	ND	ND	ND	ND	ND	< LOQ	ND	ND	< LOQ

En cuanto al carbamato con valor más alto detectado en tomate fresco tenemos en primer lugar al propamocarb con 159 ug.kg^{-1} , el methomyl con 107 ug.kg^{-1} y en tercer lugar a la carbendazim con 90 ug.kg^{-1} .

Todos los mercados y supermercados presentaron presencia de carbamatos, pero cabe resaltar que de todos ellos el **mercado 1** presentó sólo una presencia de carbamato, la carbendazim. Y la que presentó mayor cantidad de carbamatos fue el **supermercado 4** con 6 Carbamatos detectados de los cuales 4 están por debajo del LOQ.

Otro dato relevante es la comparación de las concentraciones entre los valores medios de los mercados y supermercados, tal y como lo muestra el gráfico 8 y la Tabla XXX los supermercados presentan valores de carbamatos más altos que los mercados municipales.

Tabla XXX. Promedios de valores de carbamatos en Mercados y Supermercados de Guayaquil

	Mercados	Supermercados
<i>Propamocarb</i>	7.08	13.01
<i>Oxamyl</i>	< LOQ	< LOQ
<i>Carbendazim</i>	10.85	19.49
<i>Methomyl</i>	< LOQ	13.87
<i>Pirimicarb</i>	< LOQ	< LOQ
<i>Carbaryl</i>	< LOQ	< LOQ
<i>Indoxacarb</i> *	1.05	2.4

* Muestras que dieron valores cuantificables pero que la media entre el total de los valores hayados están por debajo del límite de cuantificación establecido.

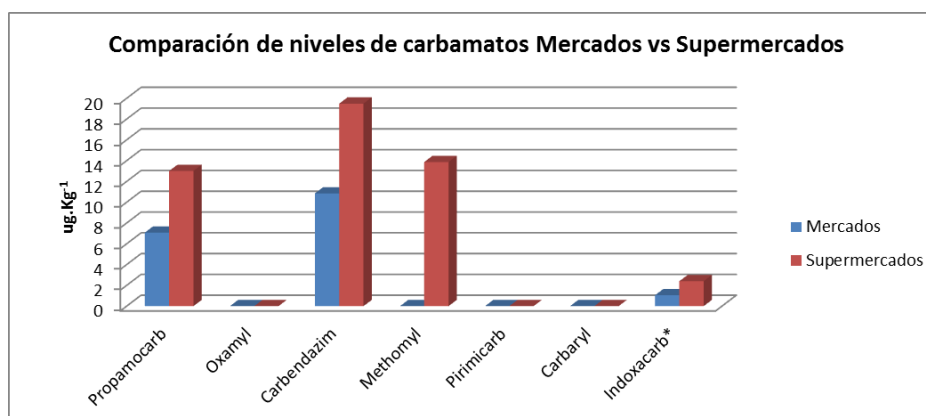


Gráfico 8. Comparación de los niveles de carbamatos detectados en Mercados y Supermercados de Guayaquil.

4.4. Límites máximos residuales de Carbamatos en tomate riñón

De los valores hallados sólo el methomyl superó por dos ocasiones, 107 y 87 ug.kg⁻¹, el LMR establecido por la EC para muestras de tomates (20 ug.kg⁻¹), ver Tabla XXXI. Esta muestra que no cumple las Buenas Prácticas Agrícolas BPA según normas europeas fue detectada en el supermercado 4.

Tabla XXXI. Carbamatos que se encuentran por encima de los LMR establecidos

Muestra	Carbamato	No. de muestras violativas	
		CODEX	EC
Tomate	Propamocarb	0	0
	Oxamyl	0	0
	Carbendazim	0	0
	Methomyl	0	2
	Pirimicarb	0	0
	Aldicarb	0	0
	Propoxur	0	0
	Carbofuran	0	0
	Carbaryl	0	0
	Methiocarb	0	0
	Propyzamide	0	0
	Fenoxycarb	0	0
	EPTCarbamato	0	0
	Indoxacarb	0	0

En datos generales existe un buen manejo de la aplicación del grupo de pesticidas carbamatos. El tiempo de carencia, que se define como el tiempo entre la última aplicación de los pesticidas y la respectiva cosecha, se lleva adecuadamente por la baja presencia de residualidad de los carbamatos que fueron estudiados. Si bien se nota una mayor cantidad de presencia y concentración en supermercados que en mercados estos se podrían explicar cómo una mejor conservación que tiene el producto postcosecha, con ambientes refrigerados y sin exposición directa al sol, situación que no ocurre con los productos que se expenden en los mercados.

4.5. Ingesta Diaria Admisible IDA

Los niveles detectados de carbamatos en tomate riñón no representan riesgo alguno a la salud ya que no aportan ni el 1% a la IDA establecidos por el Codex y por la EC. En la Tabla XXXII se muestran los cálculos realizados en base al consumo per cápita de tomate fresco [6] en el Ecuador g/día/persona y relacionado con los IDA establecidos por el Codex como por la EC.

Tabla XXXII. Ingesta diaria de Carbamatos en la dieta ecuatoriana por consumo de tomate riñón.

Carbamatos	IDA (mg.kg ⁻¹ peso corporal)		IDA (mg.persona ⁻¹) ^a		Mercados			Supermercados		
	FDA WHO	EC	FDA / WHO	EC	mg.kg ⁻¹ ^b	mg.11g ⁻¹ ^c	% Ingesta	mg.kg ⁻¹	mg.11g ⁻¹	% Ingesta
ALDICARB	0.003	0.003	0.15	0.15						
CARBARYL	0.008	0.0075	0.4	0.375						
CARBENDAZIM	0.03	0.02	1.5	1	0.011	0.0001	0.0121	0.019	0.0002	0.0209
CARBOFURAN	0.001	0.001	0.05	0.05						
EPT CARBAMATO	-	-								
FENOXYCARB		0.053	0	2.65						
INDOXACARB	0.01	0.006	0.5	0.3						
METHOMYL	0.02	0.0025	1	0.125				0.014	0.0002	0.1232
METHIOCARB	0.02	0.013	1	0.65						
OXAMYL	0.009	0.001	0.45	0.05						
PROPAMOCARB	0.4	0.29	20	14.5	0.007	0.0001	0.0005	0.013	0.0001	0.0010
PROPOXUR		0.02	0	1						
PIRIMICARB	0.02	0.035	1	1.75						
PROPYZAMIDE		0.02	0	1						

^a Basado en un peso promedio de 50 kg

^b Concentración media hallada en muestras de tomate riñón.

^c Consumo diario en gramos de tomate riñón por persona al año 2009, fuente FAOSTAT.

5. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo con fin de máster se desarrolló una técnica rápida, sencilla y con un alto nivel de precisión y recuperación para la determinación de 14 carbamatos en matriz de tomate riñón. Se logró disminuir el tiempo de extracción con la utilización de la técnica QUECHERS, disminuir el tiempo de corrida y el consumo de solventes con la utilización de un equipo UPLC.
2. La técnica propuesta se logró validar en base a los requisitos exigentes de la Unión Europea. Todos los objetivos de la validación se cumplieron de acuerdo a la directriz SANCO para especificidad, precisión, exactitud, linealidad y al Codex Alimentarius para el porcentaje de incertidumbre. Se demostró linealidad en un rango de 2.5 a 80 ug.kg⁻¹, se estableció un LOQ de 5 ug.kg⁻¹, cuyo valor está por debajo de los LMR de los catorce carbamatos en matriz de tomates.
3. En el análisis de las muestras reales tomadas de los puntos de muestreo se logró comprobar la presencia de 7 residuos de carbamatos, entre los cuales se encuentran: Propamocarb, Oxamyl, Carbendazim, Methomyl, Pirimicarb, Carbaryl e Indoxacarb. Los niveles de carbamatos varían de acuerdo al lugar donde son expendidos, se logró observar que los niveles de residuos de carbamatos vendidos en supermercados son más altos que los que se expenden en los diferentes mercados municipales. Una de las razones principales se debe a que en los supermercados se encuentran en mejores condiciones ambientales que los que son vendidos en mercados, clima controlado y sin ninguna exposición solar, este ambiente ayuda a conservar la hortaliza pero también ayuda a impedir la degradación normal de los carbamatos permitiendo que su nivel de concentración no disminuya con el paso del tiempo.
4. Aunque existió presencia de residuos de carbamatos en las muestras de tomates analizadas ninguno superó los LMR establecidos en el Codex Alimentarius. En cuanto a los LMR de la Unión Europea existieron dos muestras que superaron el límite con respecto al compuesto methomyl. En términos generales existe un buen cumplimiento de buenas prácticas de agricultura para el cultivo del tomate riñón.

5. No existe un riesgo latente de intoxicación crónica de carbamatos por consumo diario de tomate, ya que los valores de ingesta obtenidos no representaron ni el 1 % de la IDA para cada carbamato analizados en este estudio.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm. L*, 221, 8-36.
2. European Commission. (2002). Commission Directive 2002/63/EC of 11 July 2002 establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal origin and repealing Directive 79/700/EEC.
3. Jeremy C. Shia, Michael S. Young and Diane M. Diehl. (2008). Multiresidues Analysis of Pesticides in fruits using Disque, a Dispersive Solid Phase Extraction Kit. Waters Corporation, Milford Massachusetts USA.
4. FAO. (2013). FAOSTAT. Recuperado JULIO 7, 2013, de <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
5. MAGAP. (2013). SINAGAP. Recuperado el 7 de Julio de 2013, de <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/tomate-rinon-2>
6. FAO. (2013). FAOSTAT. Recuperado JULIO 7, 2013, de <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=609&lang=es#ancor>.
7. Agarwa, I.A., Rao, A.V., 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal* 163, 739–744.
8. Rao, A. V. and Agarwal, S. (1999) Role of lycopene as anti-oxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutrition Research* 19, 305-323.

9. Rein, D., Schijlen, E., Kooistra, T., Herbers, K., Verschuren, L., Hall, R., et al. (2006). Transgenic flavonoid tomato intake reduces C-reactive protein in human Creactive protein transgenic mice more than wild-type tomato. *Journal of Nutrition*, 136, 2331-2337.
10. Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W., Bramley, P.M., 1994. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development' evidence for tissue-specific gene expression. *Plant Physiology* 105, 405–413.
11. Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Garth, J., Muir, D.Z., Katz, N.B., 2002. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine* 227, 845–851.
12. Burns, J., Paul, D., Fraser, P., Bramley, M., 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochemistry* 62, 939–947.
13. Paetau, I., Khachik, F., Brown, E.D., Beecher, G.R., Kramer, T.R., Chittams, J., Clevidence, B.A., 1998. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 1187–1195.
14. Halevy, S., Koth, H., Guggenheim, K., 1957. The vitamin and mineral content of fruits and vegetables grown in Israel. *British Journal of Nutrition* 11, 409–413.
15. Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44, 1528-1535.

16. Premuzic, Z., Bargiela, M., Garcia, A., Rendina, A., Iorio, A., 1998. Calcium, iron, potassium, phosphorus, and vitamin C content of organic and hydroponic tomatoes. *Horticultural Sciences* 33, 255–257.
17. Guil-Guerrero, J. L., & Reboloso-Fuentes, M. M. (2009). Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (< i> Lycopersicon esculentum</i>) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 123-129.
18. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
19. Canene-Adams, K., Campbell, J. K., Zaripheh, S., Jeffery, E. H., & Erdman, J. W., JR. (2005). The tomato as a functional food. *Journal of Nutrition*, 135, 1226-1230.
20. Crespo-Corral E, Santos-Delgado MJ, Polo-Diez LM and Soria AC (2008). "Determination of carbamate, phenylurea and phenoxy acid herbicide residues by gas chromatography after potassium tert-butoxide/dimethyl sulphoxide/ethyl iodide derivatization reaction", *J Chromatogr A*, 1209, pp 22-28.
21. Janssen MMT (1997). "Contaminants In: Food Safety and Toxicity", Vries, J. (Ed.), CRC Press LLC, ISBN 0-8493-9488-0, first edition, Boca Raton, USA, pp. 61-71.
22. Tomlin, CDS, eds. (1997). *The Pesticide Manual*, 11th ed. Surrey, UK: British Crop Protection Council.
23. Paiga P, Morais S, Correia M, Alves A, and Delerue-Matos C (2009a). "Screening of Carbamates and Ureas in Fresh and Processed Tomato

- Samples using Microwave-Assisted Extraction and Liquid Chromatography”, *Anal Lett*, 42, pp 265-283.
24. Stella, V., Borchardt, R., Hageman, M., Oliyai, R., Maag, H., & Tilley, J. (Eds.). (2007). *Prodrugs: Challenges and rewards* (Vol. 5). Springer.
25. Ecobichon, D.J., 2001. Carbamate insecticides, in: Krieger, R. (Ed.), *Handbook of Pesticide Toxicology*, Vol 2. Academic Press, San Diego, pp. 1087–1106.
26. Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). The pharmacological basis of therapeutics. Goodman and Gilmans. *McGraw Hill, New York*. Pág. 204-205.
27. Mencías Rodríguez, E., & Mayero Franco, L. M. (2000). Manual de toxicología básica. *Madrid: Diaz Santos Editores*. Pág. 557-558.
28. Krieger, R. (2001). *Handbook of pesticide toxicology* (Vol. 1). Academic Press. Pag 1087-1088.
29. Kuhr, R. J., & Dorough, H. W. (1976). Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry, and toxicology (p. 301pag). Cleveland, OH: CRC press.
30. IAEA. (2011, Octubre 19). *PPDB ALDICARB*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/19.htm>
31. IAEA. (2012, Enero 2). *PPDB CARBARYL*. Recuprado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/115.htm#none>
32. IAEA. (2012, Agosto 7). *PPDB CARBENDAZIM*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/116.htm>

33. IAEA. (2012, Enero 1). *PPDB CARBOFURAN*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/118.htm>
34. IAEA. (2011, Octubre 11). *PPDB EPTC*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/268.htm>
35. IAEA. (2012, Agosto 6). *PPDB FENOXICARB*. Retrieved Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/304.htm>
36. EU (2005), SANCO/1408/2001. Review Report Identity, physical and chemical properties Indoxacarb.
37. IAEA. (2012, Agosto 3). *PPDB METOMILO*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/458.htm>
38. IAEA. (2012, Octubre 5). *PPDB METHIOCARB*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/457.htm>
39. IAEA. (2012, Agosto 3). *PPDB OXAMYL*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/498.htm>
40. IAEA. (2012, Agosto 3). *PPDB PIRIMICARB*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/530.htm>

41. IAEA. (2012, Agosto 3). *PPDB PROPAMOCARB*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/544.htm>
42. IAEA. (2011, Agosto 7). *PPDB PROPOXUR*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/553.htm>
43. IAEA. (2012, Agosto 2). *PPDB PROPYZAMIDE*. Recuperado Mayo 31, 2013, from IAEA NUCLEUS:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/556.htm>
44. Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P., & Jolliet, O. (2002). Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture, ecosystems & environment*, 93(1), 379-392.
45. EU Pesticides DataBase. Residuos de pesticidas en Tomate. Actualizado 28 de Enero del 2013. Recuperado el 27 de febrero del 2013, de
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=commodity_resultat
46. Codex Alimentarius. Residuos de plaguicidas en alimentos y piensos, Tomate. Actualizado en el año 2011. Recuperado el 27 de febrero del 2013 de
<http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=320>
47. European Commission. (2005). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and

- animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union, 13(03), 2005.
48. Mayer-Helm, B., Hofbauer, L., & Müller, J. (2006). Development of a multi-residue method for the determination of 18 carbamates in tobacco by high-performance liquid chromatography/positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry, 20(4), 529-536.
49. Fernández, M., Picó, Y., & Manes, J. (2000). Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 871(1), 43-56.
50. Schenck, F. J., Brown, A. N., Podhorniak, L. V., Parker, A., Reliford, M., & Wong, J. W. (2008). A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. Journal of AOAC International, 91(2), 422-438.
51. Sanchez-Brunete, C., Albero, B., & Tadeo, J. L. (2004). High-performance liquid chromatography multiresidue method for the determination of N-methyl carbamates in fruit and vegetable juices. Journal of Food Protection®, 67(11), 2565-2569.
52. Mickova, B., Zrostlikova, J., Hajslova, J., Rauch, P., Moreno, M. J., Abad, A., & Montoya, A. (2003). Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of< i>

- N-methylcarbamate insecticides in baby food. *Analytica chimica acta*, 495(1), 123-132.
53. IUPAC. (1993) Recommendations on Nomenclature for Chromatography, *Pure Appl Chem.*, 65, 819–872.
54. Snyder L., Kirkland J. (1979), "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2da. Ed., J. Wiley, N.Y.
55. Quattrocchi, O. A., de Andrizzi, S. I. A., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC: aplicación y práctica*. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro. Pág. 4-36.
56. Scott R.P.W. "Liquid Chromatography Detectors", *Journal of Chromatography Library*, Vol 33, Elsevier Science Publisher 2da edition 1986.
57. Poole, C. (2009). *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science* (Vol. 1). Academic Press. pág. 412-418.
58. AEA. (2012). *Agencia Estatal Antidopaje*. Recuperado el 27 de mayo de 2013, de Sitio web de aea.gob.es: <http://www.aea.gob.es/media/126618/espectrometr%C3%ADa%20de%20masas-nuevo.pdf>
59. Skoog, D. H., Nieman, F., & de Análisis Instrumental, T. P. (2001). Editorial McGRAW-HILL. España. Quinta edición. Pág, 271.
60. Ardrey, R. E. (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. Wiley. Pag. 99-101
61. Hoffmann, & V. Stroobant, (2007). Tandem Mass Spectrometry Scan Modes. In E. d. *Mass Spectrometry Principles and Applications* (pp. 192-195). England: John Wiley & Sons Ltd.

62. Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
63. Eurachem Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics, LGC, Teddington, Middlesex, UK, 1998 (<http://www.Eurachem.bam.de>).
64. Schröck, A. (2012). *Development of an LC-MS/MS Method for the Detection of the Alcohol Biomarker Phosphatidyl-Ethanol (PEth) in Blood* (Doctoral dissertation).
65. Bpm, I. E. C., IFCC, I., IUPAC, O., & OIML, I. (1993). *Guide to the expression of uncertainty in measurement*. ISO, Geneva.
66. Alves, M. (2012) Cálculo de Incertidumbre de medición. QML tecnológica
67. Guide to the expression of Uncertainty in Measurement, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAP, IUPAC, OIML, (1995).
68. Schmid, W. A., & Martínez, R. J. L. GUÍA PARA ESTIMAR LA INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN.
69. Document No. SANCO/12495/2011, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf).
70. Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 59-2006: Guidelines on estimation of uncertainty of results, www.codexalimentarius.net/download/standards/10692/cxg_059e.pdf
71. Leandro, Cristiana C., et al. "Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole

mass spectrometry with polarity switching." Journal of chromatography A 1144.2 (2007): 161-169.

72. Lehotay, Steven J., et al. "Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables." Journal of Chromatography A 1217.16 (2010): 2548-2560.

7. ANEXOS

Anexo A

Selectividad. Comparación de las transiciones de cuantificación y cualificación para cada carbamato y su blanco matriz.

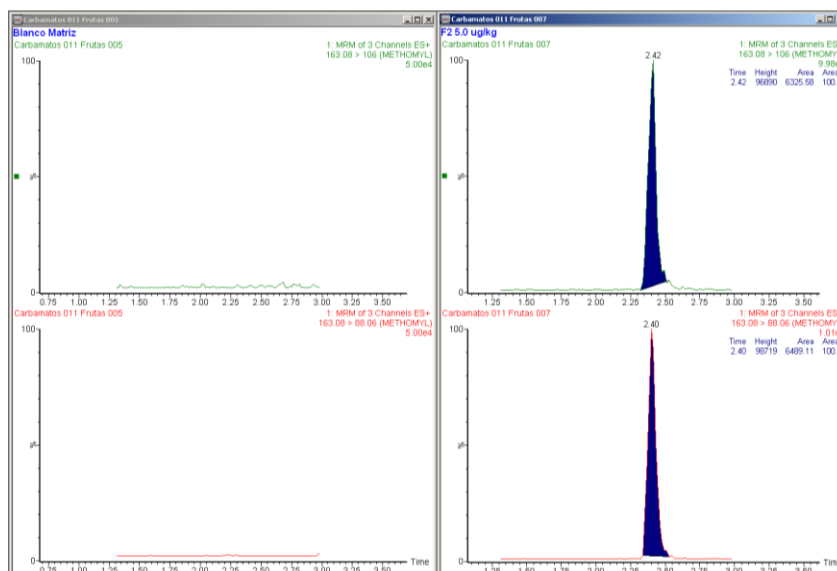


Figura A-1. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con methomyl a 5 ug.kg⁻¹.

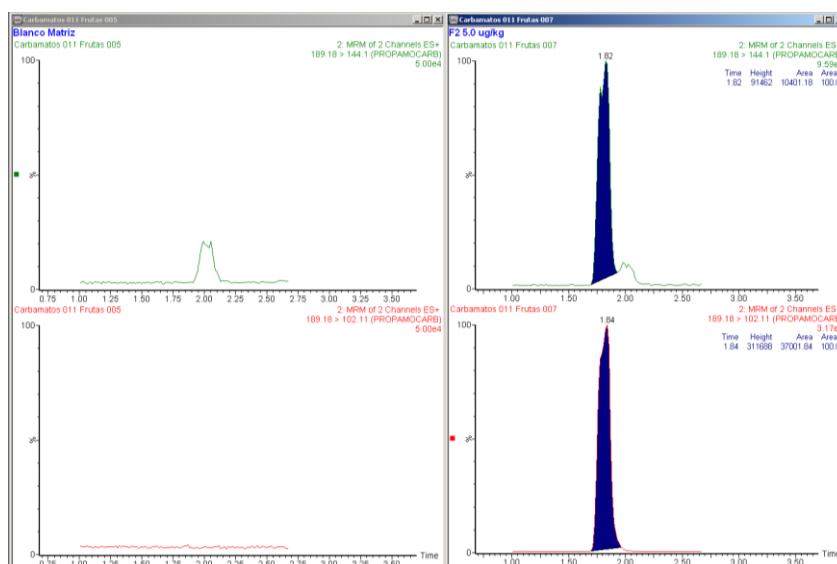


Figura A-2. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con propamocarb a 5 ug.kg⁻¹.

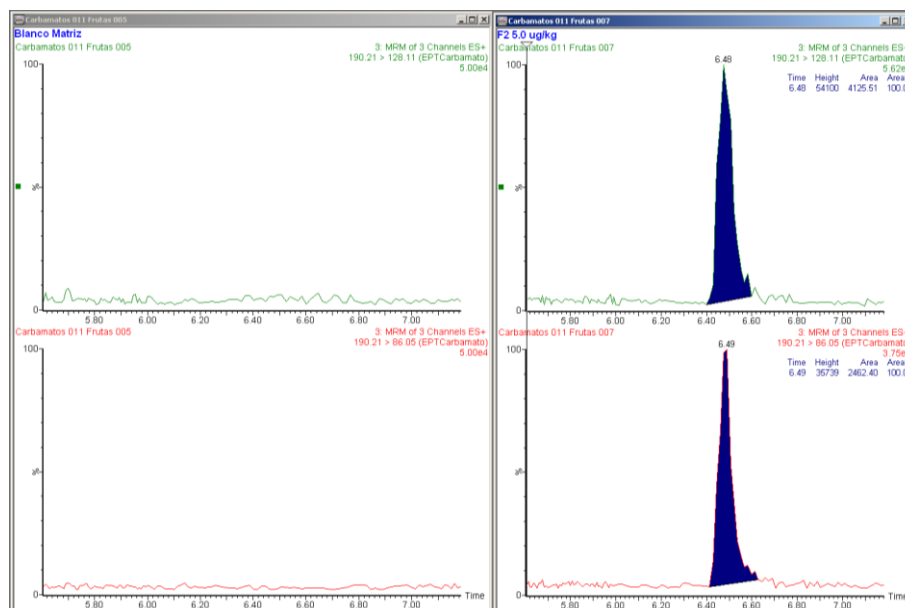


Figura A-3. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con EPTC a 5 ug.kg⁻¹.

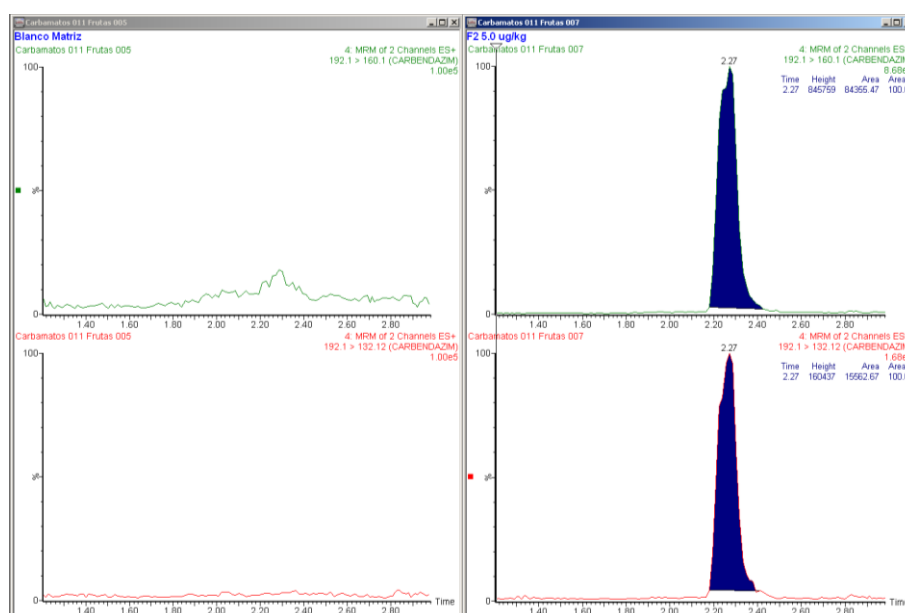


Figura A-4. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con carbendazim a 5 ug.kg⁻¹.

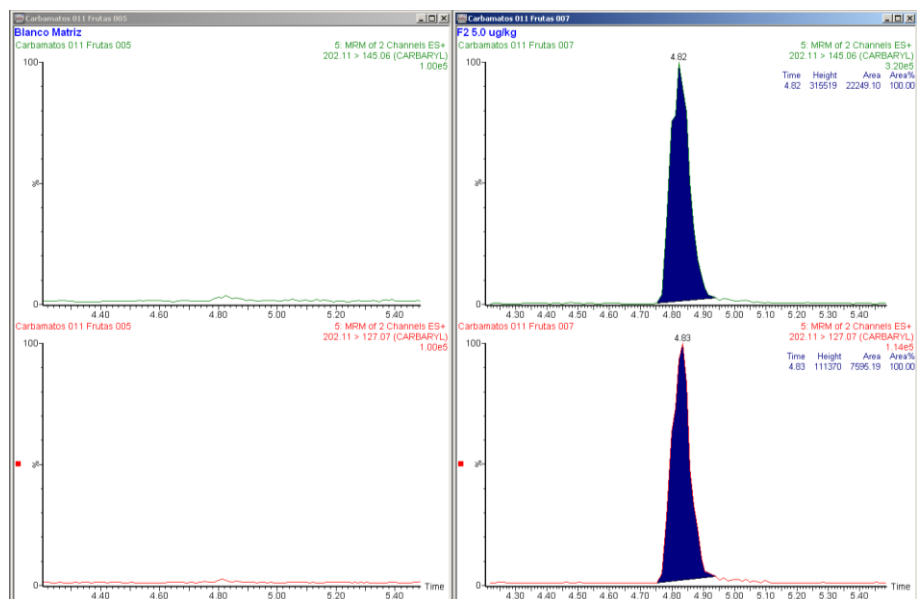


Figura A-5. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con carbaryl a 5 ug.kg⁻¹.

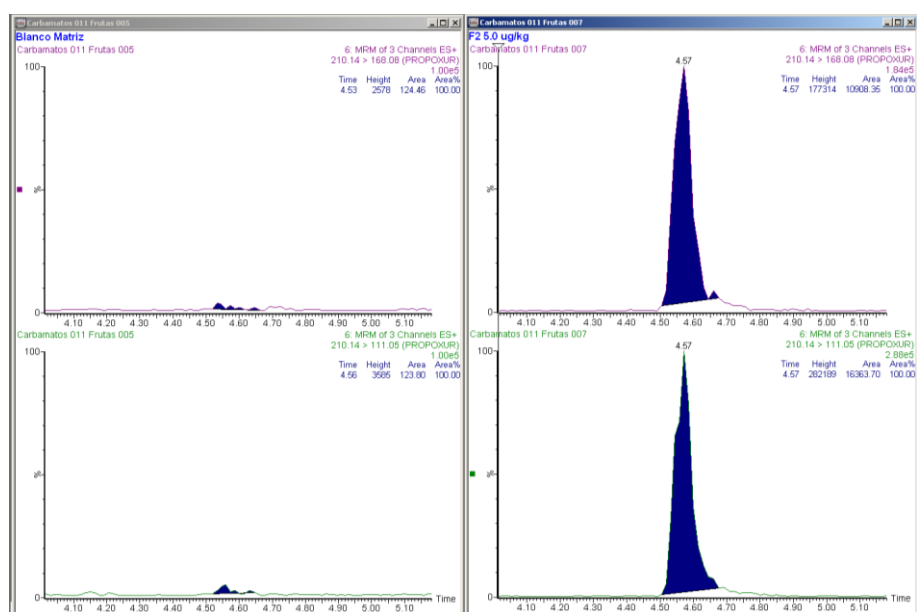


Figura A-6. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con propoxur a 5 ug.kg⁻¹.

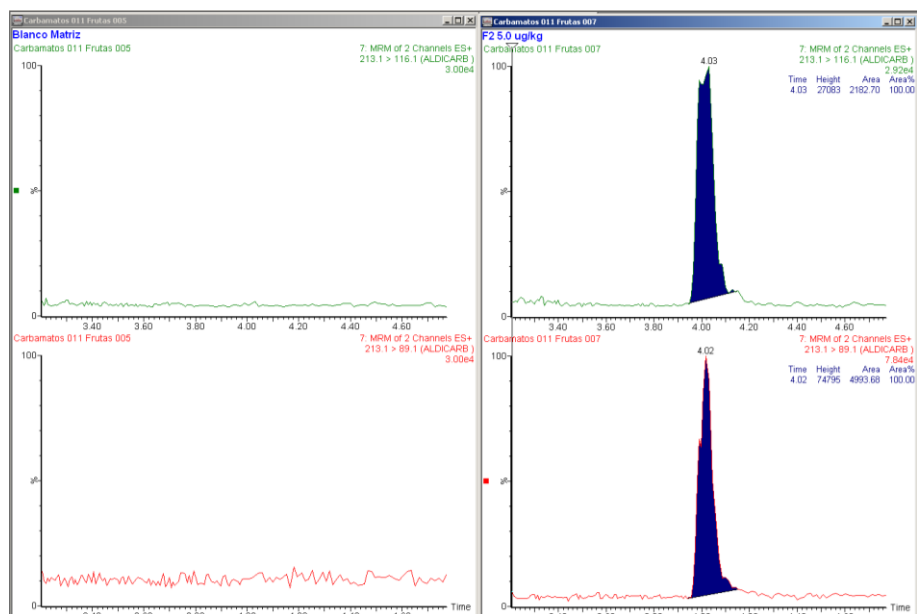


Figura A-7. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con aldicarb a 5 ug.kg⁻¹.

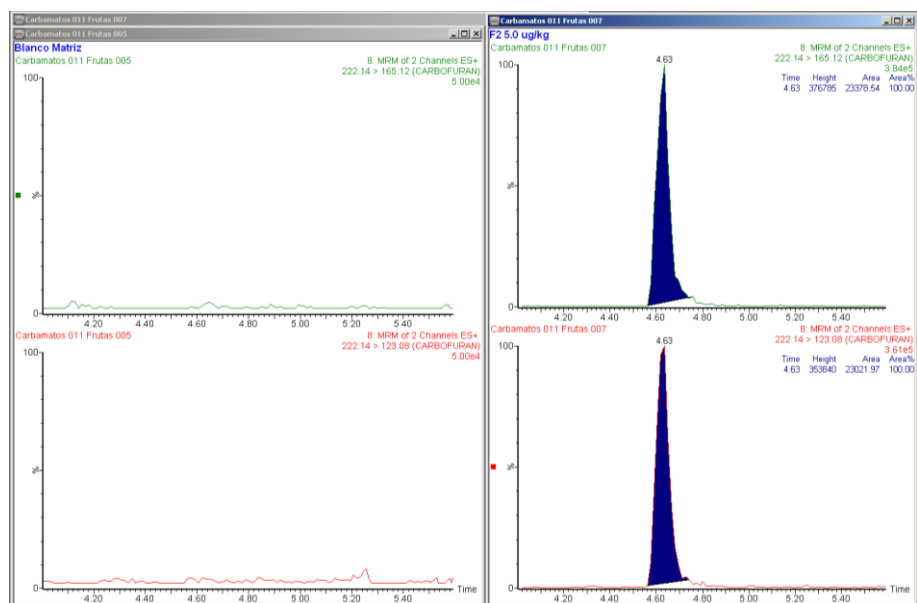


Figura A-8. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con carbofuran a 5 ug.kg⁻¹.

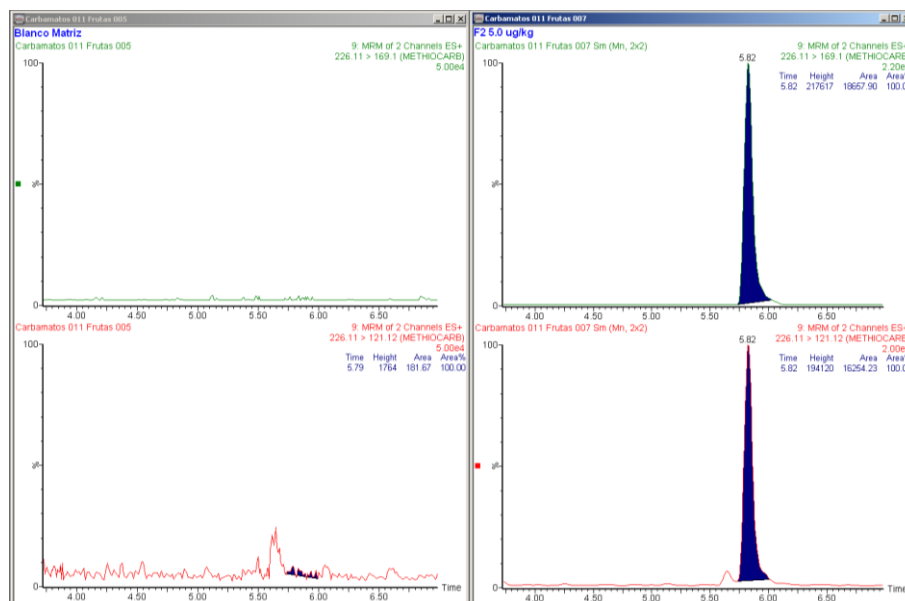


Figura A-9. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con methiocarb a 5 ug.kg^{-1} .

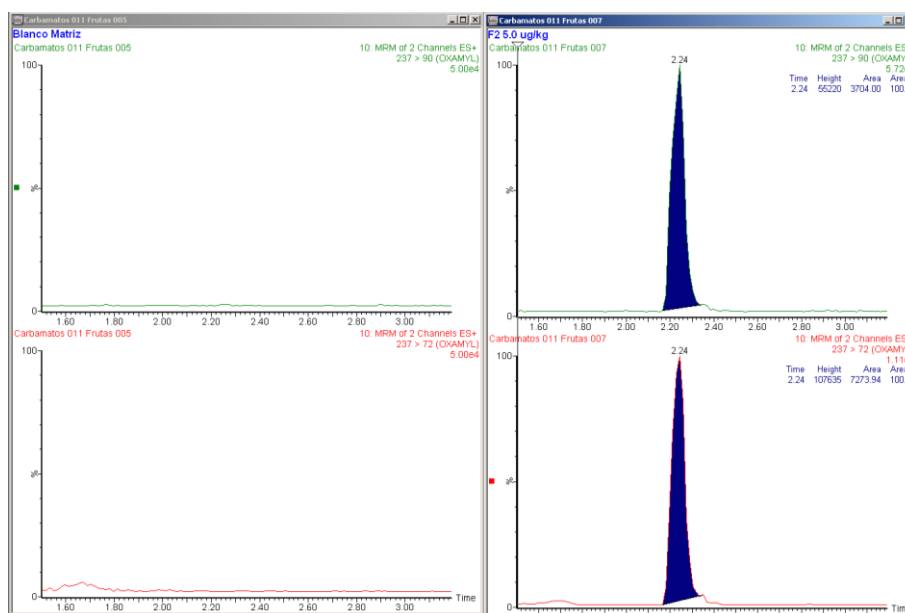


Figura A-10. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con oxamyl a 5 ug.kg^{-1} .

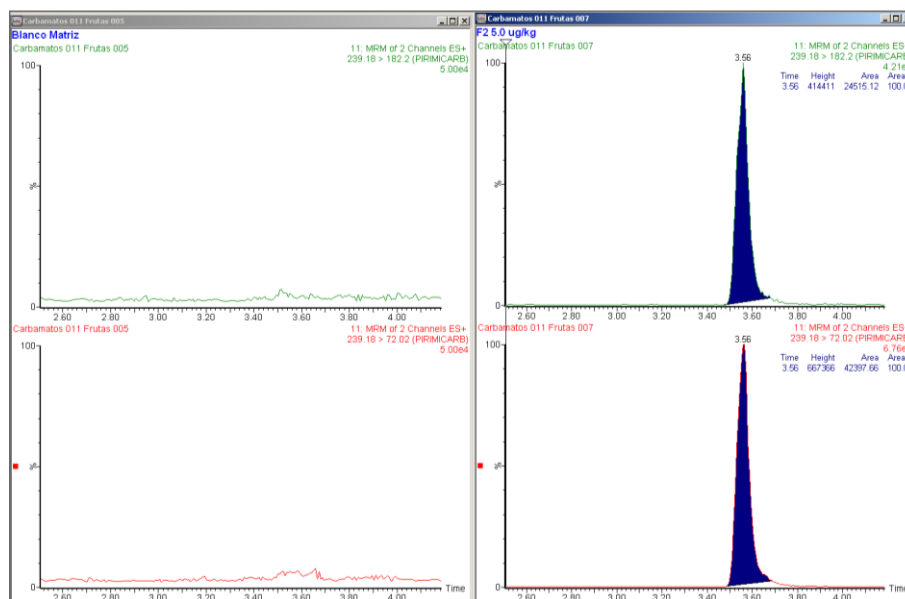


Figura A-11. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con pirimicarb a 5 ug.kg⁻¹.

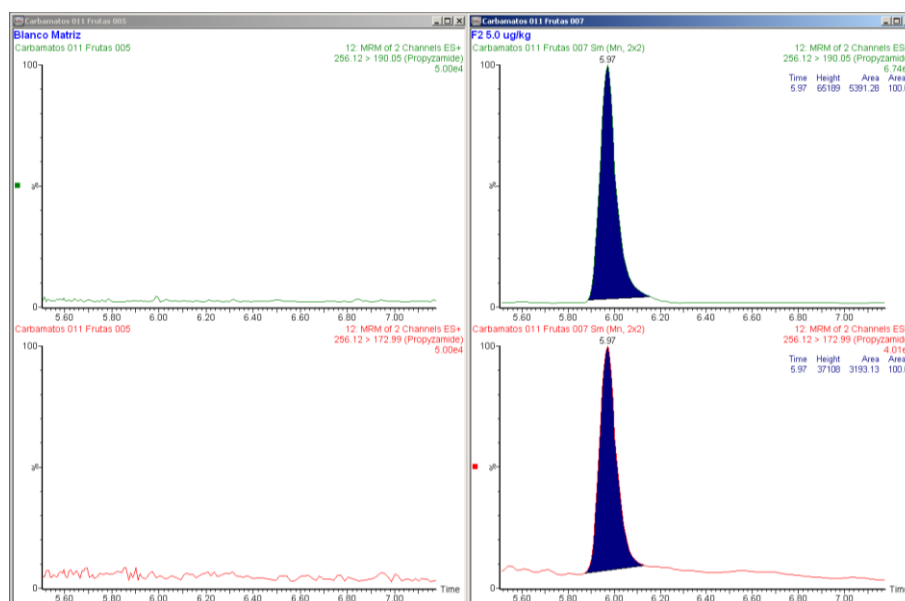


Figura A-12. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con propyzamide a 5 ug.kg⁻¹.

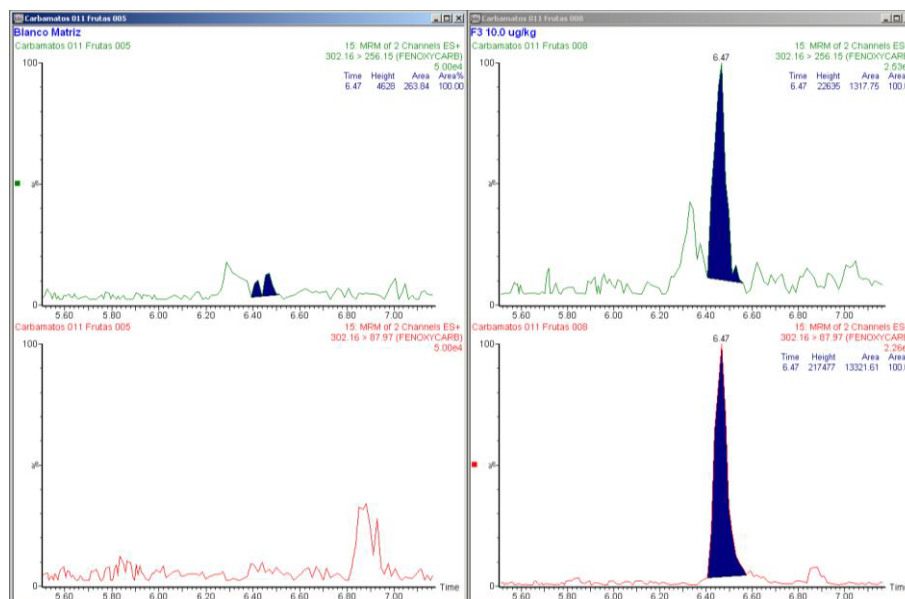


Figura A-13. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con fenoxycarb a 10 ug.kg⁻¹.

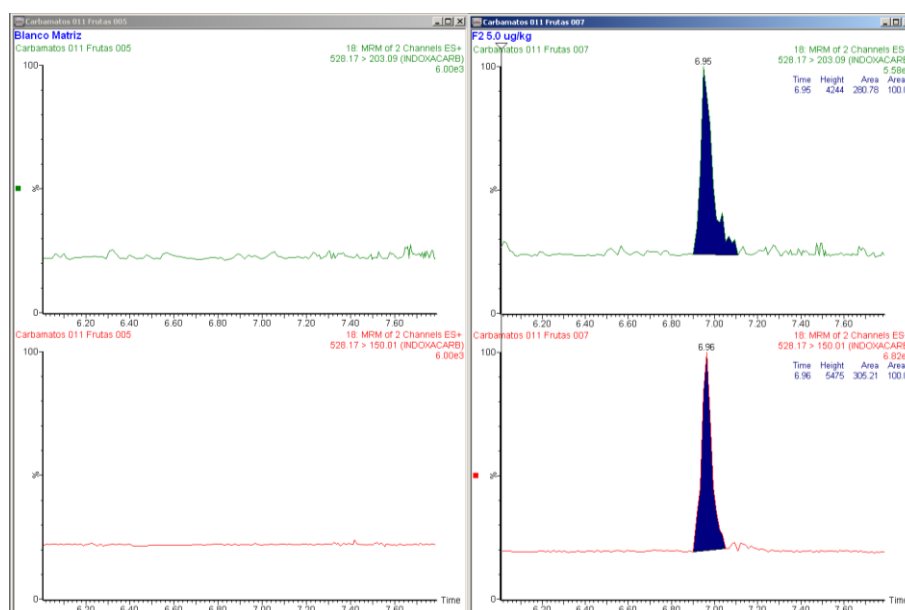


Figura A-14. Cromatograma blanco matriz y muestra fortificada con indoxacarb a 5 ug.kg⁻¹.

Apéndice B

Curvas de calibrado tomadas del primer día de validación.

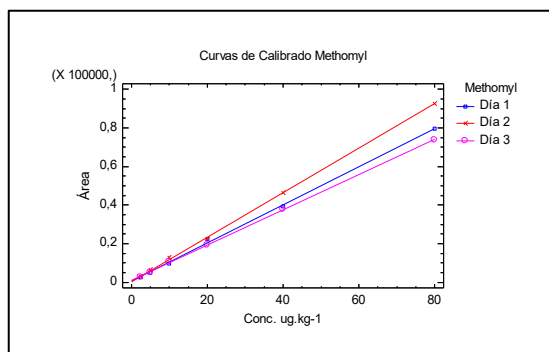


Gráfico B-1. Curvas de calibrado methomyl

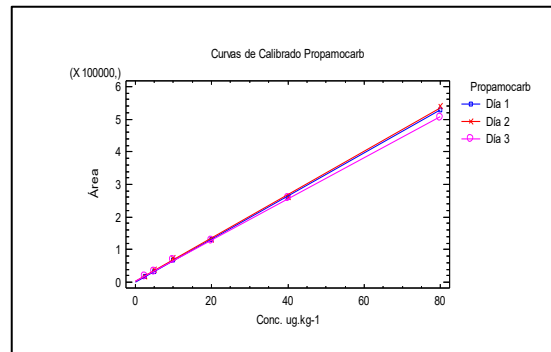


Gráfico B-2. Curvas de calibrado propamocarb

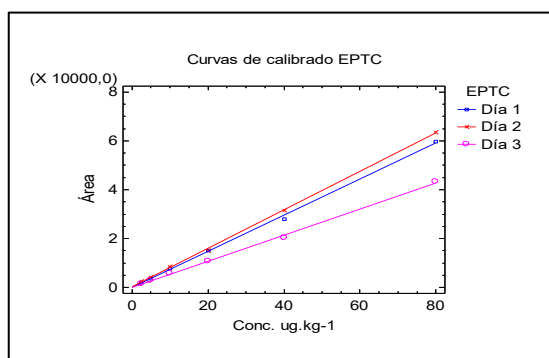


Gráfico B-3. Curvas de calibrado EPTC

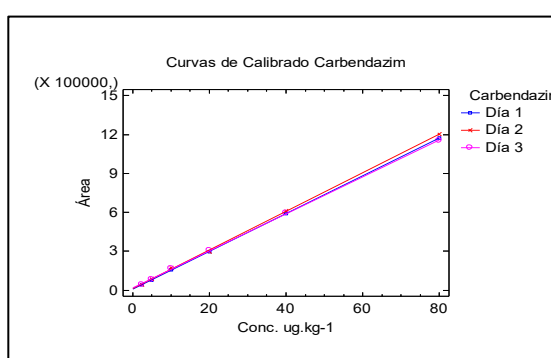


Gráfico B-4. Curvas de calibrado carbendazim

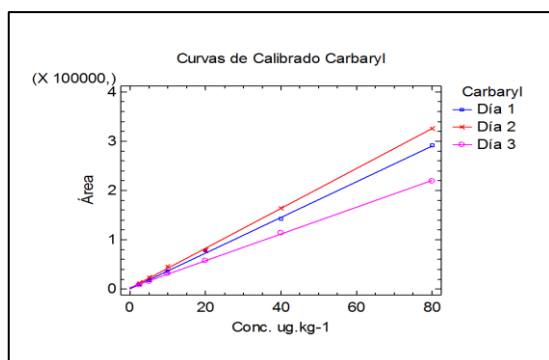


Gráfico B-5. Curvas de calibrado carbaryl

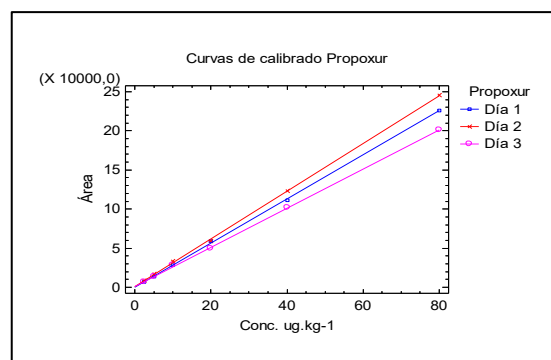


Gráfico B-6. Curvas de calibrado propoxur

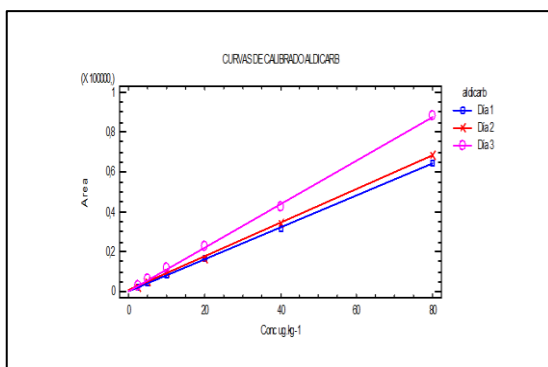


Gráfico B-7. Curvas de calibrado Aldicarb

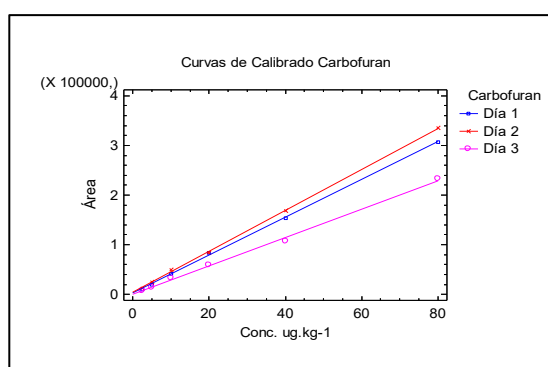


Gráfico B-8. Curvas de calibrado Carbofuran

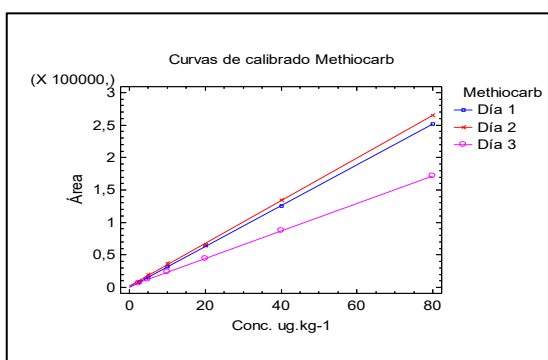


Gráfico B-9. Curvas de calibrado methiocarb

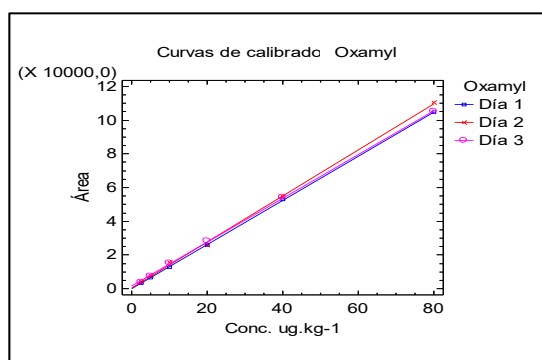


Gráfico B-10. Curvas de calibrado Oxamyl

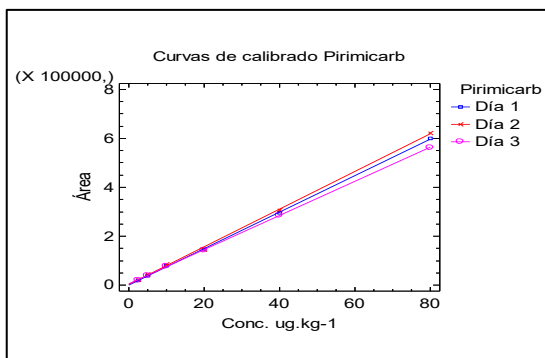


Gráfico B-11. Curvas de calibrado pirimicarb

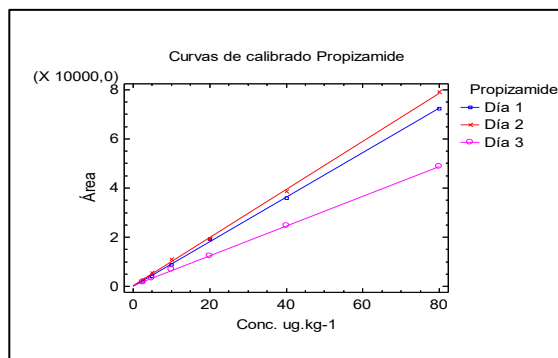


Gráfico B-12. Curvas de calibrado propizamide

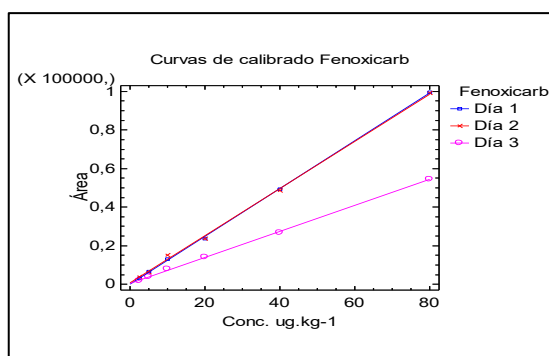


Gráfico B-13. Curvas de calibrado fenoxicarb

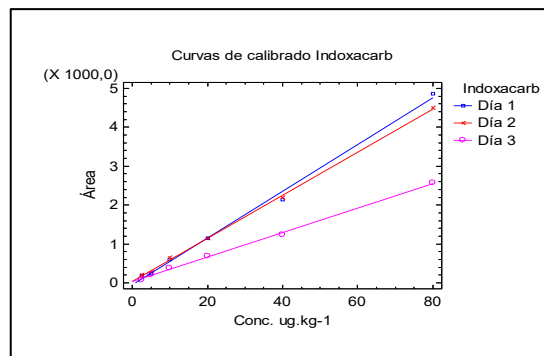


Gráfico B-14. Curvas de calibrado indoxacarb

APENDICE C

Informe de validación Methomyl

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Methomyl
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectrómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Methomyl en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	1026.90
Intercepto, a	400.19

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	1.56	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.51	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVr	SR	%CVR	%Recuperación		ug.kg ⁻¹
5.00	0.153	2.98	0.166	3.23	102.5	±	0.51
10.00	0.361	3.32	0.361	3.32	108.5	±	0.76
15.00	0.744	4.48	0.763	4.59	110.7	±	1.41
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	887.58	a	1207.69
Ordenada al origen:	- 775.81	a	1304.06
Coefficiente de correlación, mín	0.9986		
Coefficiente de determinación, mín	0.9975		
Sy	535.04		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de validación Propamocarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Propamocarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Propamocarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	6516.70
Intercepto, a	2118.67

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	0.52	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.63	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹
5.00	0.106	2.06	0.159	3.10	102.5	± 0.63
10.00	0.175	1.63	0.464	4.35	106.8	± 1.01
15.00	0.497	3.05	0.766	4.70	108.7	± 1.47
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹						

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	6176.37	a	6974.74
Ordenada al origen:	- 1460.44	a	8235.74
Coefficiente de correlación, mín	0.9991		
Coefficiente de determinación, mín	0.9983		
Sy	1127.17		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación EPTC

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	EPTCarbamato
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para EPTCarbamato en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	681.49
Intercepto, a	220.23

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	2.71	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	1.24	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.237	4.90	0.238	4.91	96.9	±	1.24
10.00	0.404	3.87	0.586	5.61	104.4	±	1.53
15.00	0.663	4.19	0.663	4.19	105.6	±	1.49
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	499.23	a	809.86
Ordenada al origen:	- 399.70	a	774.84
Coefficiente de correlación, mín	0.9989		
Coefficiente de determinación, mín	0.9979		
Sy	615.5		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Carbendazim

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Carbendazim
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Carbendazim en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	14685.07
Intercepto, a	8985.54

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	0.47	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.58	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.114	2.23	0.153	2.99	102.2	±	0.58
10.00	0.233	2.15	0.347	3.21	108.2	±	0.81
15.00	2.07	12.18	2.20	12.97	113.1	±	3.91
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	13906.72	a	15703.65
Ordenada al origen:	- 798.83	a	20240.47
Coefficiente de correlación, mín	0.9992		
Coefficiente de determinación, mín	0.9984		
Sy	2277.3		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Carbaryl

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Carbaryl
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Carbaryl en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	3476.45
Intercepto, a	1510.90

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	2.57	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.42	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹
5.00	0.100	1.99	0.135	2.68	100.9	± 0.42
10.00	0.240	2.28	0.370	3.51	105.3	± 0.77
15.00	0.452	2.79	0.534	3.29	108.1	± 1.02
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹						

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	2649.47	a	4244.97
Ordenada al origen:	- 2009.28	a	5589.90
Coefficiente de correlación, mín	0.9991		
Coefficiente de determinación, mín	0.9981		
Sy	2979.44		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Propoxur

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Propoxur
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Propoxur en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	2793.57
Intercepto, a	863.73

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	1.38	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.59	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹
5.00	0.190	3.67	0.238	4.58	103.7	± 0.59
10.00	0.163	1.48	0.277	2.53	109.5	± 0.62
15.00	0.450	2.67	0.450	2.67	112.4	± 0.85
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹						

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	2417.08	a	3166.44
Ordenada al origen:	- 1399.23	a	3560.67
Coefficiente de correlación, mín	0.9994		
Coefficiente de determinación, mín	0.9988		
Sy	1282.97		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Aldicarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Aldicarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Aldicarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	912.47
Intercepto, a	403.37

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	2.38	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.86	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.177	3.38	0.220	4.19	104.9	±	0.86
10.00	0.233	2.10	0.620	5.58	111.0	±	1.32
15.00	0.533	3.13	0.769	4.52	113.4	±	1.46
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	770.41	a	1141.30
Ordenada al origen:	- 350.16	a	1262.77
Coefficiente de correlación, mín	0.9991		
Coefficiente de determinación, mín	0.9982		
Sy	725.05		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Carbofuran

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Carbofuran
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Carbofuran en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	3634.21
Intercepto, a	1378.10

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	2.75	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	1.21	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.198	3.84	0.295	5.73	102.9	±	1.21
10.00	0.246	2.24	0.651	5.92	109.9	±	1.49
15.00	0.716	4.38	0.716	4.38	109.0	±	1.48
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	2590.39	a	4405.81
Ordenada al origen:	- 3114.89	a	6195.81
Coefficiente de correlación, mín	0.9973		
Coefficiente de determinación, mín	0.9946		
Sy	3331.98		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Methiocarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Methiocarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Methiocarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	2860.25
Intercepto, a	1142.33

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	2.95	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.49	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.180	3.56	0.180	3.56	101.2	±	0.49
10.00	0.283	2.68	0.290	2.75	105.5	±	0.64
15.00	0.421	2.58	0.450	2.76	108.8	±	0.87
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	2075.16	a	3448.08
Ordenada al origen:	- 4785.29	a	7129.99
Coefficiente de correlación, mín	0.9992		
Coefficiente de determinación, mín	0.9984		
Sy	2813.84		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Oxamyl

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Oxamyl
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Oxamyl en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	1330.92
Intercepto, a	559.57

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	0.66	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.58	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.177	3.44	0.211	4.10	102.7	±	0.58
10.00	0.253	2.33	0.330	3.05	108.4	±	0.72
15.00	0.541	3.22	0.826	4.91	112.2	±	1.50
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	1260.86	a	1436.23
Ordenada al origen:	- 325.81	a	1880.90
Coefficiente de correlación, mín	0.9989		
Coefficiente de determinación, mín	0.9979		
Sy	293.05		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Pirimicarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Pirimicarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Pirimicarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	7368.34
Intercepto, a	2702.63

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	0.73	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.77	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE						
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹
5.00	0.123	2.40	0.129	2.53	102.2	± 0.77
10.00	0.188	1.76	0.317	2.96	107.2	± 0.91
15.00	0.460	2.81	0.626	3.83	109.0	± 1.28
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹						

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	6820.81	a	8119.65
Ordenada al origen:	- 3258.50	a	10413.88
Coefficiente de correlación, mín	0.9987		
Coefficiente de determinación, mín	0.9974		
Sy	1783.03		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Propizamide

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Propizamide
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Propizamide en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	832.46
Intercepto, a	198.35

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	3.17	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.62	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.173	3.41	0.223	4.40	101.4	±	0.62
10.00	0.375	3.56	0.375	3.56	105.2	±	0.82
15.00	0.448	2.78	0.448	2.78	107.5	±	0.89
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	590.49	a	1017.49
Ordenada al origen:	- 846.45	a	1162.31
Coefficiente de correlación, mín	0.9993		
Coefficiente de determinación, mín	0.9986		
Sy	881.02		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Fenoxycarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Fenoxycarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Fenoxycarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	1045.48
Intercepto, a	398.86

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	4.16	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	0.51	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.319	6.27	0.319	6.27	101.8	±	1.26
10.00	0.631	6.05	1.04	9.98	104.4	±	2.20
15.00	0.986	6.35	0.986	6.35	103.5	±	2.06
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	636.70	a	1329.86
Ordenada al origen:	- 731.47	a	2421.74
Coefficiente de correlación, mín	0.9973		
Coefficiente de determinación, mín	0.9946		
Sy	1449.03		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	

Informe de Validación Indoxacarb

RESUMEN DE VALIDACIÓN	
Método:	Determinación de Residuos de Carbamatos en Vegetales mediante UPLCMSMS
Analito:	Indoxacarb
Unidades:	ug.kg ⁻¹
Matriz:	Tomate Riñón
Equipo:	UPLC Acquity con Espectómetro de masas XEVO TQMS fuente ESI

SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD
No se encontró evidencia bibliográfica ni experimental de interferencia para Indoxacarb en matriz de tomate riñón

FUNCIÓN DE RESPUESTA INSTRUMENTAL	
Pendiente, b	48.35
Intercepto, a	21.05

LÍMITES				
Límites	Valor	Unidades	Incertidumbre	
			Valor	Unidades
De detección:	4.11	ug.kg ⁻¹		ug.kg ⁻¹
De cuantificación:	5.00	ug.kg ⁻¹	2.71	ug.kg ⁻¹

PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE							
Niveles (ug.kg ⁻¹)	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud	U (k=2)	
	Sr	%CVR	SR	%CVR	%Recuperación	ug.kg ⁻¹	
5.00	0.790	15.10	0.927	17.71	104.7	±	2.71
10.00	0.964	9.03	1.52	14.23	106.7	±	3.30
15.00	1.09	6.70	1.54	9.64	108.5	±	3.12
Intervalo de trabajo validado: 5.00 ug.kg ⁻¹ a 80.00 ug.kg ⁻¹							

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO			
Pendiente:	- 3.26	a	113.34
Ordenada al origen:	- 84.73	a	108.71
Coefficiente de correlación, mín	0.9955		
Coefficiente de determinación, mín	0.9910		
Sy	66.2		

Fecha:	2012-12-22
Responsable:	MICHAEL RENDÓN MORÁN
Anexos:	