UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

# Evaluación de métodos para incrementar la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas

**Laura Vanessa Morales Erazo**

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2021

# Evaluación de métodos para incrementar la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas

**Laura Vanessa Morales Erazo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Química**

Directora:

Dr.Sci. Diana Cristina Sinuco León

Codirector:

M.Sc. Diego Alejandro Ahumada Forigua

Línea de Investigación:

Metrología química aplicada

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Metrología-LEA

Grupo de Investigación en Metrología Química y Bioanálisis del Instituto Nacional de Metrología de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

*A la memoria de mi abuelo*

*Que, con sus consejos y dedicación, logró fortalecer en mi el espíritu para alcanzar mis metas…*

# Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Laura Vanessa Morales Erazo

Fecha 24/09/2021

24/09/2021

# Agradecimientos

*Al concluir esta etapa profesional, además del conocimiento y las enseñanzas adquiridas quedan muchos agradecimientos para cada una de las personas e instituciones, que de una otra manera me brindaron su apoyo, y sin las cuales no hubiese sido posible desarrollar y finalizar este trabajo.*

*Primero, gracias infinitas a mis directores Diana Sinuco y Diego Ahumada, por su apoyo, su paciencia y confianza; por transmitirme sus conocimientos, por su disposición y por su amistad.*

*Gracias al Instituto Nacional de Metrología de Colombia y a su director el Dr. Edwin Cristancho (2018- 2021), por abrirme las puertas a la ciencia de la medición, por brindarme las herramientas para fortalecerme como profesional y permitirme construir país desde la química.*

*Gracias a la organización de Naciones Unidas para el desarrollo industrial ONUDI a través del programa global de calidad y normas (GQSP) y el programa para la calidad de químicos, por toda su colaboración para llevar a cabo el capítulo II de esta investigación.*

*Gracias al proyecto ColombiaMide y al Physikalisch-Technische Bundesanstalt, por su apoyo y financiación para llevar a cabo el desarrollo relacionado con los estudios de materiales de referencia de plaguicidas en matriz (Capítulo III).*

*Gracias a Vanessa Cárdenas por toda su ayuda, y por animarme a creer que podía lograrlo.*

*Gracias a mis compañeros del grupo de investigación en metrología química y bioanálisis y, al grupo de ensayos de aptitud del INM por toda su colaboración. En especial a Andrés Salinas, por el invaluable apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.*

*Gracias a mis queridos amigos Ivonne, Johanna y Diego, por haber estado ahí para mi, incluso cuando todo se tornó gris, gracias por tener siempre una voz de aliento, una sonrisa y un consejo (personal y técnico) para aclararlo todo, y seguir. Pero, sobre todo, gracias por su amistad.*

*Gracias a Diego, por su cariño, por haberme impulsado a alcanzar esta meta, por sus regaños, por todos sus conocimientos impartidos, por mostrarme siempre un horizonte y estar allí para mi, siempre. Gracias totales por ser sinónimo de felicidad.*

*Gracias a mi mami por todo su amor, esfuerzos y apoyo, por haber impulsado en mí, deseos de superación, personales y profesionales.*

*Gracias a todos a quienes directa o indirectamente han hecho parte de mi crecimiento como profesional.*

Laura Morales
2021-08-22

# Resumen

**Evaluación de métodos para incrementar la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas**

En la presente investigación se estudió el efecto del uso de diferentes estrategias sobre la estabilidad de plaguicidas seleccionados en candidatos a materiales de referencia (MR). En una primera parte, se evaluó el efecto de aditivos sobre plaguicidas en soluciones de calibración y en una segunda parte, se evaluó la influencia del uso de aditivos, matrices encapsulantes y procesos de secado, sobre la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate *hass.*

Para los estudios de soluciones calibrantes de plaguicidas, se desarrollaron y validaron diferentes métodos a través de cromatografía de gases; posteriormente, se realizaron estudios de estabilidad, los cuales evidenciaron que las estrategias de estabilización propuestas fueron efectivas, logrando estabilizar todos los plaguicidas que se mostraron inestables, lo cual se tradujo en una mejora de la incertidumbre por estabilidad de hasta 286 veces.

Por otro lado, se emplearon cuatro diferentes estrategias de estabilización sobre MR de plaguicidas en aguacate liofilizado. Los resultados mostraron que el uso de antioxidantes y conservantes, permiten incrementar la vida útil de los MR. Igualmente, se evidenció que el empleo de tecnologías de encapsulación permitió mejorar la estabilidad de los materiales; sin embargo, se encontró que, aunque la encapsulación a través de secado por aspersión permite obtener materiales con menores incertidumbres, el material obtenido es de difícil reconstitución, lo que podría conllevar a mayores errores en su uso. Por su parte, la encapsulación a través del uso de liofilización permitió establecer que la mezcla de goma arábiga-maltodextrina, proporciona un material de fácil reconstitución y con incertidumbres inferiores que el material sin ningún tratamiento.

**Palabras clave:** ***Materiales de referencia, trazabilidad metrológica, plaguicidas, estabilidad, incertidumbre, aditivos, encapsulados.***

# Abstract

**Assessment of methods for improving the stability of pesticides reference materials**

This research aims to study the effect of the use of different strategies in the stability of the selected pesticides in Reference Materials candidates. In the first part, the effect of pesticides additives in calibration solutions was evaluated. The second part is focused on the evaluation of the influence of using additives, encapsulating matrices, and drying processes on the stability of reference materials of Hass avocado pesticides.

Four methods were developed and validated for the study of pesticides in calibrant solutions. Gas chromatography coupled to mass spectrometry was the analytical technique selected. Subsequently, the stability of the materials was evaluated; these studies showed satisfactory results confirming that the proposed stabilization strategies were effective, achieving stabilizing in all the instable pesticides, representing an improvement of the uncertainty due to instability up to 286 times.

Additionally, four strategies were used to stabilize avocado pesticides undergoing freeze drying over Reference Materials-RM. The results showed that the use of additives such as antioxidants and preservatives allowed the increasing of the useful life of the RM. Also, it has been seen that the use of encapsulation technologies improves the stability of materials. However, it was found that that although spray drying obtains materials with smaller uncertainties, the material obtained is difficult to reconstitute, which could lead to greater errors during its use. On the other hand, encapsulating through freeze drying established that the mixture of gum Arabic and maltodextrin provides a material of easy reconstitution and with lower uncertainties compared with the material without any treatment.

**Keywords:** ***Reference material, metrological traceability, pesticides, stability, uncertainty, additives, encapsulates.***

# Contenido

**Pág.**

**Resumen** ..... **IX**

**Lista de figuras** ..... **XV**

**Lista de tablas** ..... **XVII**

**Lista de Símbolos y abreviaturas** ..... **XIX**

**Introducción general** ..... **1**

**1. Marco conceptual y estado del arte** ..... **5**
1.1 Marco conceptual ..... 6
1.1.1 Materiales de referencia ..... 6
1.1.2 Homogeneidad de un material de referencia ..... 6
1.1.3 Estabilidad de un material de referencia ..... 7
1.1.4 Evaluación de la estabilidad de un material de referencia ..... 7
1.1.5 Incertidumbre de un material de referencia ..... 9
1.1.6 Estrategias para el incremento de la estabilidad de productos ..... 9
1.1.7 Empleo de aditivos ..... 10
1.1.8 Empleo de encapsulados ..... 12
1.2 Estado del arte ..... 13
1.2.1 Materiales de referencia de plaguicidas ..... 13
1.2.2 Estudios de homogeneidad y estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas ..... 17
1.2.3 Uso de estrategias de estabilización sobre materiales en matriz ..... 24
1.2.4 Uso de estrategias de estabilización aplicadas a materiales de alta pureza .. 26
1.2.5 Aditivos aplicados para la estabilización de materiales de referencia en matriz 28
1.2.6 Encapsulados empleados como estrategia de estabilización ..... 28

**2. Empleo de estrategias para la estabilización de materiales de referencia en soluciones calibrantes** ..... **31**
2.1 Introducción ..... 32
2.2 Experimental ..... 33
2.2.1 Reactivos ..... 33
2.2.2 Instrumentos y equipos ..... 33
2.2.3 Selección de analitos de estudio ..... 34
2.2.4 Tratamientos estudiados ..... 36
2.2.5 Producción de lotes de materiales de referencia ..... 37
2.2.6 Estudios de estabilidad ..... 39

2.2.7 Metodologías analíticas ... 39
2.3 Resultados ... 41
2.3.1 Desarrollo de los métodos de medición ... 41
2.3.2 Validación de los métodos de medición ... 44
2.3.3 Evaluación de la estabilidad ... 53
2.3.4 Estimación de la incertidumbre debida a la inestabilidad de los materiales de referencia ... 74
2.4 Conclusiones ... 76

**3. Empleo de alternativas de estabilización de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate *(Persea americana)* ... 79**
3.1 Introducción ... 80
3.2 Experimental ... 81
3.2.1 Reactivos ... 81
3.2.2 Instrumentos y equipos ... 82
3.2.3 Tratamientos estudiados ... 83
3.2.4 Producción de los materiales de referencia ... 84
3.2.5 Estudios de estabilidad ... 90
3.2.6 Medición de plaguicidas ... 91
3.3 Resultados ... 93
3.3.1 Liofilización y uso de aditivos ... 93
3.3.2 Encapsulamiento: efecto de la matriz encapsulante ... 99
3.3.3 Encapsulamiento: efecto del proceso de secado ... 104
3.4 Conclusiones ... 110

**4. Conclusiones generales y recomendaciones ... 113**
4.1. Conclusiones generales ... 113
4.2. Recomendaciones ... 115

**5. Aplicaciones y productos ... 116**
5.1. Producción del material de referencia de residuos de plaguicidas en aguacate hass *(Persea americana)* ... 117
5.1.1. Evaluación de la homogeneidad y estabilidad del material de referencia ... 117
5.1.2. Medición de la propiedad y asignación del valor ... 118
5.2. Productos ... 119
5.2.1. Productos de desarrollo tecnológico ... 119
5.2.2. Productos de apropiación social del conocimiento ... 120
5.2.3. Productos de nuevo conocimiento ... 121

**A. Anexo: Resultados obtenidos para la evaluación de la estabilidad de PCB en soluciones de calibración ... 122**

**B. Anexo: análisis microbiológico del aguacate liofilizado ... 123**

**C. Anexo: imágenes de microscopia electrónica de barrido al material de aguacate liofilizado (T1) ... 124**

**D. Anexo: imágenes de microscopia electrónica de barrido al material liofilizado y encapsulado con maltodextrina (T3) ... 125**

**Bibliografía ... 126**

# Lista de figuras

**Pág.**

**Figura 2- 1:** Proceso general de producción de los MR ..... 38
**Figura 2- 2:** Programa de temperatura en la columna..... 41
**Figura 2- 3:** Cromatogramas obtenidos para cada uno de los MR candidatos..... 42
**Figura 2- 4:** Cromatogramas de acetato de etilo (arriba) y acetonitrilo (abajo) ..... 45
**Figura 2- 5:** Cromatogramas obtenidos de los blancos de solvente ..... 45
**Figura 2- 6:** Evaluación de la selectividad MR1..... 46
**Figura 2- 7**: Evaluación de la selectividad MR3..... 47
**Figura 2- 8:** Precisión como repetibilidad obtenida en cada método a tres diferentes niveles de concentración ..... 50
**Figura 2- 9**: Variación en la señal cromatográfica del folpet. Material saturado con atmosfera inerte ……53
**Figura 2- 10**: Detección de isómero de λ–cihalotrina (a) t=0 y (b) t=14 días..... 54
**Figura 2-11**: Evaluación gráfica de la estabilidad del MR1 sometido a un ambiente oxidativo ……56
**Figura 2-12:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 2 sometido a un ambiente oxidativo ……58
**Figura 2-13:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 3 sometido a un ambiente oxidativo ……59
**Figura 2- 14:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 4 sometido a un ambiente oxidativo ……60
**Figura 2- 15:** Cinética de primer orden de dimetoato. ..... 62
**Figura 2- 16**: Cinética de segundo orden de cipermetrina ..... 62
**Figura 2- 17**: Mejora de la estabilidad asociada a la presencia de una atmósfera inerte en las ampollas. ……63
**Figura 2- 18:** Plaguicidas que no presentaron cambios en su inestabilidad al aplicar una atmósfera inerte ……66
**Figura 2- 19:** Plaguicidas que no presentaron cambios en su estabilidad al aplicar una atmósfera inerte… ..... 67
**Figura 2- 20:** Evaluación gráfica para plaguicidas seleccionados, adicionado con ácido fórmico y atmósfera inerte. ..... 70
**Figura 2- 21:** Plaguicidas que tuvieron un incremento en su estabilidad con el empleo de ácido fórmico y atmósfera inerte. ..... 71

**Figura 3- 1:** Tratamientos de estabilización estudiados ..... 84
**Figura 3- 2:** Aguacate hass adquirido para la producción de los candidatos ..... 86
**Figura 3- 3:** Obtención de la pulpa de aguacate..... 86
**Figura 3- 4:** Proceso de producción de los candidatos a materiales de referencia .. 88
**Figura 3- 5:** Proceso de envasado de los materiales de referencia ..... 89
**Figura 3- 6:** Presentación final de los materiales de referencia ..... 90
**Figura 3- 7:** Materiales de referencia obtenidos para T1 y T2 (izquierda) y posterior a la reconstitución con agua (derecha) ..... 94
**Figura 3- 8:** Registro fotográfico del estudio de estabilidad para T1 y T2..... 94
**Figura 3- 9:** Estabilidad de plaguicidas seleccionados al aplicar el tratamiento 1 (T1) 96
**Figura 3- 11:** Estabilidad de plaguicidas seleccionados al aplicar los tratamientos T2 y T3 100
**Figura 3- 12**: Registro fotográfico del estudio de estabilidad para T3 y T4..... 102
**Figura 3- 13:** Materiales obtenidos al aplicar los tratamientos T3 (maltodextrina) y T4 (maltodextrina+goma)..... 103
**Figura 3- 14:** Material obtenido a partir del T5 ..... 105
**Figura 3- 15**: Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales T4 y T5 106
**Figura 3- 16:** Probabilidad de obtener la incertidumbre más alta (a) y más baja (b) con los diferentes tratamientos aplicados ..... 109

**Figura 5- 1:** Material de referencia ofertado por el INM como ítem de ensayo..... 117

# Lista de tablas

**Pág.**

**Tabla 1- 1:** Definición de la clasificación funcional de aditivos alimenticios. Adaptado de [15]……..11
**Tabla 1- 2:** Materiales de referencia certificados de plaguicidas en matriz, producidos por el Instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ)..... 15
**Tabla 1- 3:** Materiales de referencia de plaguicidas en matriz producidos por INMs en el mundo……16

**Tabla 2- 1:** Analitos seleccionados para el estudio (estructuras tomadas de [77]) . 34
**Tabla 2- 2:** Fracción másica de los componentes del MR 1 ..... 38
**Tabla 2- 3:** Fracción másica de los componentes del MR 2 ..... 38
**Tabla 2- 4:** Fracción másica de los componentes del MR 3 ..... 38
**Tabla 2- 5:** Fracción másica de los componentes del MR 4 ..... 39
**Tabla 2- 6:** Condiciones de los métodos cromatográficos desarrollados ..... 43
**Tabla 2- 7:** Evaluación estadística de la linealidad..... 48
**Tabla 2- 8:** Intervalos lineales de cada compuesto ..... 49
**Tabla 2- 9:** Valores de probabilidad obtenidos en la evaluación estadística de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene)..... 51
**Tabla 2- 10**: Incertidumbre estándar relativa de los métodos de medición ..... 52
**Tabla 2- 11:** Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de tendencia de medición……..55
**Tabla 2- 12:** Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales expuestos a un ambiente oxidativo ..... 60
**Tabla 2- 13**: Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales tratados con atmosfera inerte ..... 68
**Tabla 2- 14:** Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales adicionados con argón y ácido fórmico..... 73

**Tabla 3- 1**: Plaguicidas seleccionados y concentraciones de la mezcla de fortificación……..85
**Tabla 3- 2:** Características de desempeño del método de medición ..... 92
**Tabla 3- 3:** Resultados obtenidos en la evaluación de las cineticas de reacción e incertidumbre debida a la estabilidad de T1 y T2 ..... 97
**Tabla 3- 4:** Resultados obtenidos en la evaluación de la incertidumbre asociada a la estabilidad. Tratamientos 3 y 4..... 101
**Tabla 3- 5:** Resultados obtenidos de la evaluación de la incertidumbre asociada a la estabilidad. Tratamiento (T5)..... 107

**Tabla 4- 1:** Incertidumbre debida a la homogeneidad y estabilidad del MR..... 118
**Tabla 4- 2:** Valores de probabilidad obtenidos de la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad de varianzas (Cochran) .....**¡Error! Marcador no definido.**
**Tabla 4- 3:** Valores de la propiedad y aproximación empleada para la combinación…….**¡Error! Marcador no definido.**
**Tabla 4- 4:** Valores de referencia para cada analito y sus respectivas incertidumbres……..119

# Lista de Símbolos y abreviaturas

| Símbolo | Término |
|---|---|
| $\alpha$ | Nivel de significancia |
| $k$ | Factor de cobertura |
| $m$ | Pendiente de regresión |
| p/p | Fracción másica |
| $R^2$ | Coeficiente de determinación |
| T | Tratamiento |
| t | Tiempo |
| $u$ | Incertidumbre estándar |

## Subíndices

| Subíndice | Término |
|---|---|
| hom | Homogeneidad |
| est | estabilidad |
| elp | Estabilidad de largo plazo |
| ecp | Estabilidad de corto plazo |
| car | Caracterización |
| obj | Objetivo |
| min | Mínimo |

# Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|---|---|
| ANOVA | Análisis De Varianza |
| BHA | Butil Hidroxianisol |
| BTH | Butul Hidroxitolueno |
| CV | Coeficiente De Variación |
| DDD | Dicloro Difenil Dicloroetano |
| DDE | Dicloro Difenil Dicloroetileno |
| DDT | Dicloro Difenil Tricloroetano |
| ECD | Detector De Captura Electrónica |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetracético |
| ESI | Electrospray Ionization |
| FAO | Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura |
| GC | Gas Chromatography |
| GC-MS | Gas Chromatography Mass Spectrometry |
| GUM | Guía Para La Expresión De La Incertidumbre De Medición |
| HCB | Hexaclorobenceno |
| HCH | Hexaclorohexano |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HRMS | High Resolution Mass Spectrometry |
| IDMS | Isotopic Dilution Mass Spectrometry |
| INM | Instituto Nacional De Metrología |
| ISO | Organización Internacional De Normalización |
| JRC | Joint Research Center |
| KRISS | Korean Reseach Institute of Standards and Science |
| LC | Liquid Chromatography |
| LMR | Limite Máximo De Residuos |
| MR | Material De Referencia |
| MRC | Material De Referneica Certificado |
| MS/MS | Espectrometria De Masas En Tándem |
| NCI | Ionización Quimica En Modo Negativo |
| NMIJ | National Metrology Institute of Japan |
| NIM | National Institute of Metrology of China |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| PCB | Polichlorinated Bifenile |
| PEAD | Polietileno De Alta Densidad |
| PMR | Productor De Material De Referencia |
| PSA | Primary Secondary Aminne |
| QuEChERS | Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe) |
| SI | Sistema Internacional De Unidades |
| UV | Ultra Violeta |

# Introducción general

A través de los métodos de medición es posible evaluar la calidad de un producto, determinar el estado de contaminación de un ecosistema, evaluar la conformidad de un alimento, determinar la eficiencia de un proceso, evaluar tratamientos médicos, respaldar los procesos de investigación científica, entre otro gran número de aplicaciones. Por lo anterior, en las últimas décadas se ha prestado especial atención a todo lo concerniente a la armonización de métodos de medición y desarrollo de referencias que permitan establecer cadenas de trazabilidad metrológica, obtener comparabilidad y asegurar la validez de los resultados.

En este contexto, los materiales de referencia (MR) juegan un papel fundamental para alcanzar este objetivo; ya que pueden ser empleados en el desarrollo, validación, y verificación de métodos analíticos, permitiendo obtener resultados de calidad y comparables entre diferentes laboratorios a lo largo del tiempo, [1]. Por lo cual, los productores de materiales de referencia (PMR) y otras instituciones alrededor del mundo han centrado esfuerzos en el desarrollo de referencias de medición, en concordancia con los intereses económicos o sociales de los diferentes países o regiones.

La continua necesidad de llevar a cabo análisis de diferentes mensurandos ya sean de naturaleza orgánica, inorgánica, biológica, entre otros, es el origen del aumento de la demanda de los materiales de referencia. Actualmente en la base de datos COMAR [2] se

encuentran registrados más de 7200 MR, los cuales son en mayor parte producidos por países desarrollados. Desafortunadamente, para los países en vías de desarrollo, muchos de los materiales de referencia existentes no son aplicables a las mediciones nacionales, de tal manera se ha hecho necesaria la creación de instituciones gubernamentales que tengan dentro de sus funciones el desarrollo y producción de materiales de referencia, con el propósito de suplir las necesidades particulares de cada país.

Por otra parte y teniendo en cuenta la definición de la guía ISO 30:2015, un MR debe ser homogéneo y estable en sus propiedades de acuerdo al uso previsto [3], por lo que los PMR deben realizar estudios de estabilidad, con el propósito de asegurar que las propiedades certificadas mantengan su valor dentro del tiempo de vigencia o de certificación del material. Sin embargo, es justamente la inestabilidad de algunos analitos la que limita en gran medida la producción de MR. En esencia, los analitos o la matriz pueden sufrir procesos de descomposición en la etapa de almacenamiento del material candidato, lo cual se traduce en tiempos de vida media bajos, incertidumbres altas o la imposibilidad de certificar los MR.

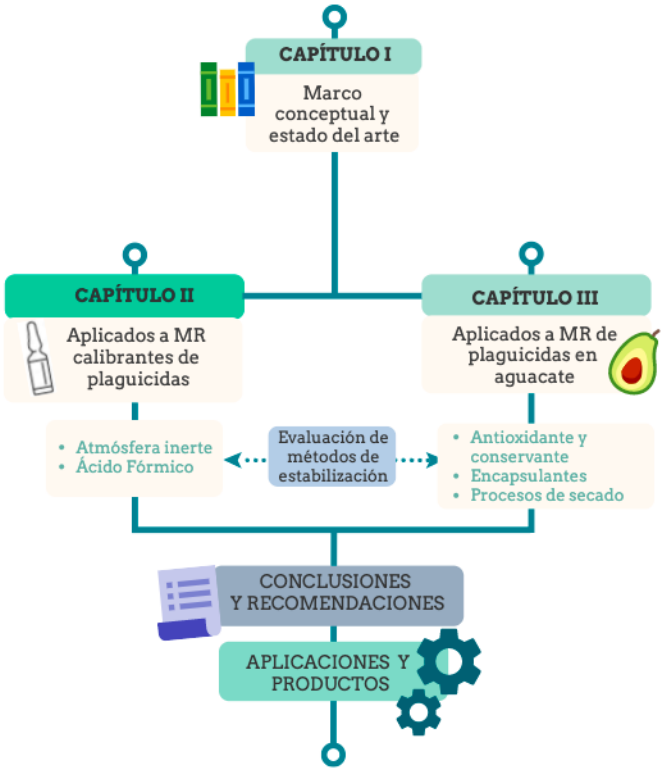
La degradación o pérdidas de los compuestos durante el proceso de almacenamiento del candidato a MR puede ocurrir principalmente, debido a procesos de hidrólisis, oxidación del material o pérdidas por volatilidad, asociados al analito o a la matriz. Por ejemplo, al trabajar con frutas o alimentos algunos compuestos como los ditiocarbamatos se descomponen debido a procesos enzimáticos u oxidativos [4],[5]. Dichos procesos de descomposición o pérdida se llevan a cabo, debido de volatilidad del analito, temperatura de almacenamiento o transporte, luz, humedad, oxígeno, actividad microbiológica, pH, entre otras [5],[6], por lo cual los productores de materiales de referencia deben presentar especial atención a estos factores.

Un buen ejemplo de analitos inestables son los plaguicidas, pues es bien conocido que muchos de estos compuestos no son estables en matrices e incluso en algunos de estos en las soluciones de calibración, lo cual se traduce que sólo cerca del 1,5% de los materiales ofertados correspondan a materiales de referencia certificados de plaguicidas [6].

# Introducción

En este contexto, el principal objetivo trazado en la presente tesis de maestría, se orientó a evaluar la aplicación de diferentes métodos de estabilización que permitan incrementar significativamente la estabilidad de analitos de interés como los plaguicidas para la producción de materiales de referencia, permitiendo la conservación de las propiedades certificadas, aumentar el tiempo de vigencia, la disminución de las incertidumbres debidas a la inestabilidad y con ello, favoreciendo la producción de nuevos materiales de referencia para dar cumplimiento a la demanda del país.

El presente documento esta organizado con el propósito de mostrar el desarrollo y validación de los métodos de medición empleados, la producción de los materiales de referencia evaluados (calibrantes y en matriz), la aplicación de las estrategias que se presentaron como alternativa para incrementar la estabilidad y finalmente, los estudios de estabilidad que permitieron establecer la efectividad de estas alternativas. Como se muestra en la siguiente figura, este documento se encuentra dividido en tres capítulos.




En el **capítulo I**, se presentan algunos conceptos que enmarcan el objetivo de esta investigación y se presenta un resumen general de los principales aportes de las

investigaciones más relevantes en torno a métodos de estabilización y sus aplicaciones en materiales de referencia.

Posteriormente, en el **capítulo II** se presenta el estudio del efecto del uso de aditivos sobre la estabilidad de plaguicidas en materiales de referencia calibrantes, para ello se realiza el desarrollo y validación de cuatro métodos de medición a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y, la producción de los materiales de referencia candidatos y, se presentan los resultados de los estudios de estabilidad y estimación de incertidumbre.

En el **capitulo III**, se registran los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad de materiales de referencia, al emplear cinco diferentes tratamientos de estabilización, los cuales fueron aplicados a los materiales de referencia de plaguicidas en aguacate *hass* producidos durante esta investigación.

En una cuarta sección, se presentan las conclusiones y recomendaciones generales para futuros estudios y finalmente, las aplicaciones y productos de I+D+i obtenidos al implementar los resultados de esta investigación en la producción de materiales de referencia de plaguicidas.

# 1. Marco conceptual y estado del arte

El presente capítulo tiene como objetivo abordar los conceptos más relevantes relacionados con la producción de materiales de referencia y con las estrategias comúnmente empleadas para incrementar la estabilidad de productos, esto con el fin de facilitar la lectura de los capítulos posteriores. Para ello, se presenta el estado actual del arte en torno a la producción de materiales de referencia de plaguicidas, los conceptos y diseños más relevantes para realizar estudios de homogeneidad y estabilidad en materiales de referencia. Sumado a lo anterior, se presenta una revisión relacionada con el uso de aditivos o materiales encapsulantes en matrices como alimentos o agroquímicos.

# 1.1 Marco conceptual

## 1.1.1 Materiales de referencia

Un material de referencia es definido como un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, el cual ha sido establecido como adecuado para su uso previsto en un proceso de medición; si este material es además caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido, está acompañado de un certificado de material de referencia el cual provee un valor de la propiedad, una incertidumbre asociada y una declaración de trazabilidad metrológica, se trata de un material de referencia certificado (MRC) [3]. De acuerdo con esta definición, la homogeneidad y la estabilidad son dos características cruciales de todo material de referencia, por lo que los PMR deben realizar estudios para demostrar que sus materiales cumplen con estos requerimientos.

## 1.1.2 Homogeneidad de un material de referencia

La mayoría de los MR se preparan como lotes de unidades, por lo que es necesario asegurar que todas las unidades tengan el mismo valor dentro de la incertidumbre declarada para cada propiedad certificada, por lo que el productor debe realizar la evaluación de la homogeneidad de cualquier material de referencia.

La homogeneidad de un MR se puede ver desde dos perspectivas, la primera se refiere a la variación de la propiedad a certificar entre unidades separadas del material [8], por ejemplo, si se prepara un lote de 100 unidades (botellas independientes), hace referencia a la variación que la propiedad puede tener entre cada una de las botellas. Desde otra perspectiva, la homogeneidad de un material también se refiere a la variación de la propiedad dentro de cada unidad o botella preparada, por ejemplo, una de las botellas preparadas puede tener una cantidad determinada de un mensurando, pero solo se emplea una submuestra para la medición, por lo cual es necesario conocer cuál es la variación asociada a este submuestreo dentro de la botella.

La evaluación de la variación entre las unidades siempre es necesaria y si aplica, también es necesario evaluar la variabilidad en el interior de la unidad (heterogeneidad dentro de

la unidad). Esta evaluación permite proporcionar instrucciones de uso que controlen este impacto y, establecer, por ejemplo, la mínima cantidad de muestra que debe emplearse del material.

### 1.1.3 Estabilidad de un material de referencia

La estabilidad de un material de referencia, se refiere a la capacidad del material de mantener el valor declarado dentro de los límites especificados durante determinado tiempo cuando es almacenado, o transportado bajo condiciones específicas [3], es decir, los MR deben ser lo suficientemente estables para su uso previsto, de modo que el usuario final pueda confiar en el valor asignado en cualquier punto dentro del periodo de validez del certificado. Es importante tener en cuenta la estabilidad en las diferentes condiciones a las que puede ser sometido el material, por lo que se debe considerar la estabilidad durante el almacenamiento y en condiciones de transporte, e incluso se puede considerar la estabilidad del material después de la apertura, cuando se permita ser usado en más de una ocasión.[8]

### 1.1.4 Evaluación de la estabilidad de un material de referencia

El valor de cada propiedad certificada en un material de referencia puede cambiar considerablemente con el tiempo dependiendo de: las condiciones a las que es sometido, la naturaleza de los analitos y la complejidad de las matrices. Algunos materiales cambian casi linealmente durante largos periodos [9]; otros pueden sufrir cambios rápidos autocatalíticos o menos predecibles después de un período de estabilidad y, otros pueden cambiar rápidamente durante un período inicial después del procesamiento y luego permanecer estables durante largos periodos.

Por lo anterior, siempre existe el riesgo de que el valor de una o más de las propiedades cambien inesperadamente durante la vida útil de un material de referencia, teniendo incluso como consecuencia la inviabilidad de la producción del material a causa de su inestabilidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el PMR debe realizar la evaluación de la estabilidad y garantizar de este modo que el material será estable durante todo el periodo de vida útil que se le sea asignado, esto implica la realización de estudios para estimar cualquier

cambio en los valores de propiedad certificados debido a la inestabilidad. Para ello, se evalúan dos tipos de estabilidad a (i) largo plazo y (ii) corto plazo.

La estabilidad a largo plazo de un MR se asocia con el comportamiento de este durante el almacenamiento, mientras que la estabilidad a corto plazo se refiere al efecto producido debido las condiciones de transporte a las que puede estar sometido el material. El PMR debe, antes de disponer el material a los usuarios, evaluar la estabilidad de cada propiedad de interés bajo condiciones razonablemente esperadas [8]. Teniendo en cuenta las condiciones y los tratamientos aplicados los estudios de estabilidad se pueden clasificar en [8]:

- *Estudios de estabilidad en tiempo real*

La estabilidad del MR es estudiada bajo las condiciones de almacenamiento que son previstas para este. Esto significa que, en una semana, mes o un año el estudio de estabilidad proporciona información sobre el comportamiento del material durante el período de tiempo determinado.

- *Estudios de estabilidad acelerada*

En este estudio se realizan múltiples experimentos, los cuales son realizados bajo las condiciones más extremas de almacenamiento o transporte a las que puede estar sometido el material, con el fin de inducir una más rápida degradación que se podría experimentar en las condiciones de almacenamiento previstas.

Y dependiendo de las condiciones de medición, los estudios de estabilidad se clasifican en:

- *Estudios de estabilidad clásicos-condiciones de precisión intermedia*

En estos estudios, se realiza la medición del material, bajo condiciones idénticas en diferentes periodos de tiempo, en un tiempo cero (en el momento de asignar el valor) y en tiempos subsecuentes con una duración predeterminada. Este tipo de estudios tiene como desventaja que pueden contribuir más ampliamente sobre la incertidumbre debido a que se debe tener en cuenta la variabilidad en el tiempo del sistema de medición lo que podría incidir en una mayor dispersión de los resultados.

- *Estudios de estabilidad isócronos- condiciones de repetibilidad*

Estos estudios implican un almacenamiento bajo condiciones de referencia, estas son condiciones bajo las cuales se espera que las propiedades de interés del material se mantengan estables, y las que serán empleadas como referencia para evaluar las unidades que han sido expuestas a otras condiciones de almacenamiento seleccionadas, en las cuales podría tener lugar una degradación de los analitos.

### 1.1.5 Incertidumbre de un material de referencia

Desde la perspectiva de la Guía para la expresión de la incertidumbre en la medición (GUM)[10], la incertidumbre asociada a una propiedad certificada en un material de referencia (uMRC) se estima mediante la siguiente expresión:

$$u_{MRC} = \sqrt{u_{car}^2 + u_{hom}^2 + u_{elp}^2 + u_{ecp}^2} \quad (1.\ 1)$$

Dónde los términos $u_{car}$ y $u_{hom}$ hacen referencia a las incertidumbres asociadas a la caracterización y a la homogeneidad del lote, y los términos $u_{elp}$ y $u_{ecp}$ corresponden a los aportes por estabilidad a largo plazo y corto plazo, respectivamente. Es importante notar que las incertidumbres asociadas con la degradación no necesariamente reflejan una degradación aparente. Incluso en ausencia de degradación visible, estas incertidumbres no son nulas debido a que se consideran las incertidumbres asociadas a las mediciones utilizadas para determinar esta degradación[11].

Dependiendo del material de referencia que se pretenda desarrollar y su uso previsto, se debe establecer un requisito de incertidumbre que garantice que el material es adecuado para su uso.

### 1.1.6 Estrategias para el incremento de la estabilidad de productos

En diferentes sectores de la industria se han venido desarrollando y empleando diferentes estrategias para brindar estabilidad a productos de diferentes índole. Algunas de las alternativas más empleadas corresponden a: (i) el uso de aditivos que inhiben la degradación temprana de los productos y consecuentemente permiten que estos

conserven sus propiedades por un mayor tiempo y (ii) el uso de tecnologías de encapsulamiento que protegen al analito de factores que causan su degradación. A continuación, se mencionan algunas de las generalidades de estas dos alternativas.

### 1.1.7 Empleo de aditivos

Los aditivos son sustancias especialmente usadas en la industria alimenticia que se añaden a un producto para: asegurar la seguridad y salubridad, mantener el valor nutritivo, potenciar la aceptación del consumidor, facilitar los procesos de fabricación, envasado, transporte y almacenamiento, dar homogeneidad y para aumentar la calidad de conservación o su estabilidad. Estas sustancias son clasificadas de acuerdo con su clase funcional como:

- Sustancias que impiden alteraciones químicas y biológicas (antioxidantes, sinérgicos de antioxidantes y conservantes)
- Sustancias estabilizadoras de las características físicas (emulgentes, espesantes, gelificantes, antiespumantes, humectantes, reguladoras de pH)
- Sustancias correctoras de cualidades plásticas. (mejoradores de la panificación, correctores de la vinificación, reguladores de la maduración)
- Sustancias modificadoras de los caracteres organolépticos (colorantes, potenciadores del sabor, edulcorantes artificiales, aromas)

Dentro de los aditivos se encuentran dos grupos de compuestos de gran interés por su capacidad de incrementar la estabilidad de los productos; el primer grupo lo componen los antioxidantes, sustancias químicas que son capaces de retrasar el proceso de alteración oxidativa de otros compuestos o neutralizar radicales. Dentro de los principales antioxidantes se encuentran el ácido ascórbico, por su solubilidad en agua y compuestos liposolubles como el butilhidroxitolueno (BTH) y el tocoferol. Otros aditivos alimentarios (por ejemplo, los sulfitos) tienen una cierta acción antioxidante, además de la acción primaria para la que específicamente se utilizan. En el grupo de antioxidantes se incluyen también aquellas sustancias, denominadas sinérgicos de antioxidantes, que tienen acción inhibitoria por un mecanismo específico, el secuestro de las trazas de metales presentes en el alimento; estas trazas (cobre y hierro fundamentalmente) pueden encontrarse en el alimento de forma natural o incorporarse a él durante el procesamiento, y tienen una gran efectividad como aceleradores de las reacciones de oxidación [12], [13]. El segundo grupo

importante de aditivos lo componen los conservantes, sustancias empleadas para garantizar la seguridad del alimento y evitar la pérdida de la calidad derivada de las reacciones microbianas y el crecimiento de microorganismos patógenos. Existen diferentes tipos de agentes antimicrobianos, cada uno con un modo de acción particular. Algunos ejemplos de conservantes incluyen: ácidos orgánicos, parabenos, sulfitos y dióxido de azufre, antimicrobianos naturales como nisina y natamicina y algunos compuestos derivados de aceites esenciales como fenilpropenos y terpenoides, entre otros [14].

El anexo I del reglamento 1333/2008 del parlamento Europeo [15], define cada una de las clasificaciones funcionales de los aditivos. En la siguiente tabla se presentan algunas de estas definiciones.

**Tabla 1- 1:** Definición de la clasificación funcional de aditivos alimenticios. Adaptado de [15]

| *Clase funcional* | *Definición* |
|---|---|
| Edulcorante | Sustancias que se emplean para dar un sabor dulce a los alimentos o en edulcorantes de mesa |
| Colorante | Sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original |
| Conservadores | Sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro causado por microorganismos o que protegen del crecimiento de microorganismos patógenos |
| Antioxidantes | Sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos protegiéndolos del deterioro causado por la oxidación, como el enranciamiento de las grasas y los cambios de color |
| Soportes | Sustancias empleadas para disolver, diluir, dispersar o modificar físicamente de otra manera un aditivo alimentario |
| Acidulantes | Sustancias que incrementan la acidez de un producto alimenticio o le confieren un sabor ácido, o ambas cosas |

**Tabla 1-1:** (Continuación)

| *Clase funcional* | *Definición* |
|---|---|
| Correctores de acidez | Sustancias que alteran o controlan la acidez o alcalinidad de un producto alimenticio |
| Secuestrantes | Sustancias que forman complejos químicos con iones metálicos |
| Estabilizantes | Sustancias que posibilitan el mantenimiento del estado físico-químico de un producto alimenticio |
| Espesantes | Sustancias que aumentan la viscosidad de un alimento |
| Espumantes | Sustancias que hacen posible formar una dispersión homogénea de una fase gaseosa en un producto alimenticio líquido o sólido. |
| Gases de envasado | Gases, distintos del aire, introducidos en un recipiente antes o después de colocar en él un producto alimenticio, o mientras se coloca. |
| Endurecedores | Sustancias que vuelven o mantienen los tejidos de frutas u hortalizas firmes o crujientes o actúan junto con agentes gelificantes para producir o reforzar un gel. |
| Gelificantes | Sustancias que dan textura a un producto alimenticio mediante la formación de un gel. |

En muchas ocasiones las matrices de interés en la producción de materiales de referencia son matrices alimenticias, por lo que el uso de aditivos como los mencionados anteriormente resultan relevantes en el estudio, sin embargo, es de tener en cuenta que se debe garantizar que las adiciones de estos componentes no interfieren en la certificación de las propiedades del material y en el posterior uso del material.

### 1.1.8 Empleo de encapsulados

Como se mencionó anteriormente, el encapsulamiento es una técnica cuya aplicación está en auge en muchas industrias. Esta tecnología se puede definir como un proceso por el cual un núcleo (por ejemplo: ingrediente funcional o ingrediente activo) que puede ser gas, líquido o sólido es recubierto con un segundo material para formar una microcápsula. El segundo material es conocido como encapsulante, matriz, fase externa o membrana, el cual forma un recubrimiento uniforme por oclusión o adsorción que sirve de protección al núcleo, ya que lo aísla de su entorno hasta que sea liberado por cambios controlados en su ambiente. El proceso de encapsulación protege el núcleo de condiciones adversas

debidas a cambios en el pH, reacciones de oxidación y degradación enzimática. La encapsulación es una herramienta útil para mejorar el suministro de moléculas bioactivas (por ejemplo, antioxidantes, minerales, vitaminas, fitoesteroles, luteína, ácidos grasos, licopeno) y células vivas (por ejemplo, probióticos) en los alimentos. Las partículas producidas generalmente tienen diámetros de tamaño del orden de nanómetros a micrómetros [16]–[18]

En general los procesos para obtener encapsulados están basados en fenómenos físicos, químicos o fisicoquímicos. Estos procesos incluyen: coacervación compleja, polímero-polímero incompatible, proceso de inyección sumergida, secado por atomización (*spray drying*), enfriamiento tras atomización (*spray chilling*), secado por liofilización (*freeze-Drying*), recubrimiento en lecho fluidizado, disco giratorio con orificios múltiples, coacervación simple, coacervación compleja y cocristalización. [19]–[21]

## 1.2 Estado del arte

### 1.2.1 Materiales de referencia de plaguicidas

El desarrollo de materiales de referencia de naturaleza orgánica ha tenido dos enfoques fundamentales. En el primer enfoque se parte de sustancias de alta pureza las cuales son certificadas a través de la medición indirecta de la pureza, con técnicas como resonancia magnética nuclear cuantitativa, cromatografía, espectrometría de masas, entre otras. Por otro lado, una segunda alternativa es el uso de métodos primarios tales como: titulación coulométrica, descenso crioscópico del punto de fusión, entre otras [22]–[27].

En el segundo enfoque, se realiza la certificación de los analitos de interés en matrices ya sean alimentarias, ambientales, industriales, entre otras; para lo cual es necesario el empleo de diferentes técnicas analíticas que incluyen en su mayoría cromatografía de gases y cromatografía líquida, con una gran variedad de detectores, siendo los más empleados los espectrómetros de masas [28]–[31]. Por lo anterior, la producción de materiales de referencia se encuentra fuertemente limitada a la capacidad instrumental de los Institutos Nacionales de Metrología (INMs).

En el caso de los plaguicidas, además de requerir una amplia tecnología instrumental, la producción de materiales de referencia se ve principalmente afectada por la tendencia de algunos plaguicidas a la degradación, tanto en matrices naturales como en solución [32]. Grimalt et al., [33] mencionan que previo al proceso de preparación y certificación de un MRC, se enfrentan desafíos relacionados con:

- *Selección del tipo de material*: generalmente se prefieren materiales de muestras reales o muy similares a las reales. Sin embargo, pueden ser difíciles de encontrar, preparar o son inviables por su estabilidad. En este sentido, la producción de materiales fortificados resulta ser una buena opción, aunque en algunos casos podría requerirse un estudio de conmutabilidad para demostrar la equivalencia, si la extractabilidad de los materiales se llegase a ver afectada.
- *Elección de la combinación analito/matriz representativa*: es evidente que no se puede disponer de un MRC para todas las combinaciones posibles de matriz/plaguicida (analito). Por lo que el objetivo, es proporcionar un MRC con una matriz representativa, para un conjunto de plaguicidas de diferentes clases químicas, según los requerimientos legales, su representatividad química y acorde a las capacidades analíticas.
- *Alteración del analito y la matriz*: algunos de los plaguicidas son bastante inestables, con el fin de evitar la acumulación en el ambiente. Por lo que se debe prestar especial atención en los procesos de preparación y conservación del material, para evitar la actividad biológica y demás procesos de degradación.
- *Adecuada homogeneidad y estabilidad del material*: ya que son propiedades que pueden verse afectadas por la naturaleza de las matrices y los analitos por diversos factores externos o, porque es necesaria la fortificación para la producción del material. Además, para asegurar que la homogeneidad y estabilidad de los materiales son adecuadas, se requieren metodologías analíticas altamente precisas, lo cual puede ser difícil de alcanzar cuando se trata de matrices muy complejas, se requieren múltiples pasos de extracción y limpieza, o existen efectos instrumentales como el efecto matriz, entre otros.
- *Trazabilidad metrológica*: idealmente todos los valores certificados deben ser trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI), sin embargo, la posibilidad de

lograr esto depende de la disponibilidad de MRC o métodos de medición de alta jerarquía metrológica (métodos primarios). Los cuales no siempre están disponibles.

Lo anterior hace evidente, las razones por las cuales existe un déficit en la oferta de MRC de plaguicidas. En la actualidad solo cerca del 1,50% de los materiales de referencia certificados registrados corresponden a materiales de plaguicidas, certificados en pureza y matriz, por lo que todavía hay una gran cantidad de familias de plaguicidas y matrices que no están cubiertos por ningún MRC ofertado.

Uno de los principales productores de este tipo de MRC es el Instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ, de sus siglas en inglés), el cual ha desarrollado materiales de plaguicidas certificados en pureza de compuestos como $\gamma$-hexaclorociclohexano ($\gamma$-HCH), y otros contaminantes orgánicos como bifenilospoliclorados (PCBs) [6]. Otros institutos como el Instituto Nacional de estándares y tecnología de Estados Unidos (NIST, de sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional de Metrología de China (NIM, de sus siglas en inglés), han desarrollado MRC calibrantes de algunos plaguicidas como: $\alpha$-HCH, $\beta$-HCH, oxiclordano, $\gamma$-clordano, $\alpha$+$\beta$-endosulfán, nonacloro, sulfato de endosulfán, heptacloro, dieldrina, diclorodifenildicloroetileno (DDE), diclorodifenildicloroetano (DDD), diclorodifeniltricoloretano (DDT), aldrina, endrina, y MRC de pureza como monocrotofos, isocarbofos, paclobutrazol, carbofurano, acifluorfen, promecarb, entre otros [34]–[36].
El NMIJ también ha desarrollado MRC de plaguicidas en matrices especialmente ambientales y alimenticias, los cuales han sido certificados a través del uso de técnicas cromatográficas como cromatografía de gases y cromatografía líquida, usualmente acopladas en tándem a espectrometría de masas (GC-MS/MS y LC-MS/MS, de sus siglas en inglés). En la
**Tabla 1- 2** se referencian algunos de estos materiales.

**Tabla 1- 2:** Materiales de referencia certificados de plaguicidas en matriz, producidos por el Instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ)

| *Matriz* | *Analitos certificados* | *Referencia* |
|---|---|---|
| Repollo | Clorpirifos, fenitrotión, permetrina | [37] |
| Cebolla verde | Diazinón, fenitrotión, cypermetrina, etofenprox, permetrina | [37] |

| | | |
|---|---|---|
| Manzana | Diazinón,fenitrotión, cipermetrina, permetrina | [38] |

**Tabla 1-2:** (Continuación)

| *Matriz* | *Analitos certificados* | *Referencia* |
|---|---|---|
| Soya | Diazinón,fenitrotión, clorpirifos, permetrina | [39] |
| Pescado | *Trans*-nonacloro, dieldrina, DDE, DDT, DDD | [40] |
| Arroz integral | Etofenprox, fenitrotión | [41] |
| Sedimentos marinos | DDT, DDE, DDD, $\gamma$-HCH | [42] |

Por su parte, el Joint Research Center (JRC, por sus siglas en inglés) ha desarrollado dos materiales que cubren un mayor número de plaguicidas y familias; estos materiales fueron certificados empleando cromatografía de gases y cromatografía líquida acopladas en tándem a espectrometría de masas y, otros INMs, optan por asignar el valor a través de estudios interlaboratorio (valor por consenso). La **Tabla 1-3** muestra algunos materiales de referencia certificados, desarrollados por el JRC y otros INMs a nivel mundial.

**Tabla 1- 3:** Materiales de referencia de plaguicidas en matriz producidos por INMs en el mundo

| *Matriz* | *Analitos certificados* | *Productor* | *Referencia* |
|---|---|---|---|
| Alimento para bebé (papa/zanahoria) | Forato, promizamida, vinclozolina, diazinón, metil-clorpirifos, metalaxilo, metil-prifimifós, clorpirifos, paratión, bromopropilato, permetrina | JRC | [33] |
| Pepino | Acetamiprid, axozistrobina, carbendazim, clorpirifós,cipermetrina,diazinón,$\alpha$+$\beta$ endosulfán, fenitrotión, imazalil, imidacloprid, iprodiona,malatión, metomil,tebuconazol, tiabendazol. | JRC | [43] |
| Repollo | Diazinón, ,$\alpha$+$\beta$ endosulfán, clorpirifos | KRISS | |
| Té verde | Cipermetrina | Laboratorio gubernamental de China | [44] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Té | α -endosulfán, β-endosulfán, sulfato de endosulfán | Laboratorio gubernamental de China | [45] |

**Tabla 1-3:** (Continuación)

| *Matriz* | *Analitos certificados* | *Productor* | *Referencia* |
|---|---|---|---|
| Alimento animal | Hexaclorobenceno (HCB), β-HCH, γ-HCH,heptacloro, γ-clordano, α-endosulfán, dieldrina, endrina, DDT, DDE | Comisión Europea | [46] |
| Leche en polvo | HCB, β-HCH, γ-HCH, epoxido de heptacloro, dieldrina, endrina, DDT | Comisión Europea | [47] |
| Tejido de pescado del lago Michigan | HCB, α-HCH, epóxido de heptacloro, oxiclordano, clordano, nonacloro, dieldrina, DDE, DDD, DDT. | NIST | [48] |

### 1.2.2 Estudios de homogeneidad y estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas

En el pasado, la certificación de materiales de referencia se entendía en gran parte como un proceso de asignación de valor a un material. Se hizo poco hincapié en características como la homogeneidad o la estabilidad por lo que no se realizaban muchos esfuerzos para incluir los efectos de la heterogeneidad y la degradación de los analitos en la incertidumbre del MRC, incluso si se sugiriera. Sin embargo, la creciente necesidad de generar mejores referencias ha llevado a que sea necesaria la inclusión de otras fuentes relevantes dentro del presupuesto de incertidumbre y no solo la debida a la caracterización del material. [11] Durante la revisión de las investigaciones relacionadas con estudios de homogeneidad y estabilidad realizados específicamente en materiales de referencia de plaguicidas, se encontró que en general ambos estudios se realizan acorde con las recomendaciones de la Guía ISO 35. Para el caso de los estudios de homogeneidad normalmente se emplearon alrededor del 10% de las unidades producidas seleccionadas a través de diseños aleatorios y aleatorios estratificados; se evaluó la variación entre y dentro de las unidades. La incertidumbre fue estimada en la mayoría de los casos a partir de un análisis de varianza ANOVA . Los estudios de estabilidad se realizaron siguiendo diseños clásicos e isócronos simulando condiciones de almacenamiento y transporte. Para determinar cambios en el material se evaluaron las significancias de las pendientes obtenidas durante los tiempos de estudio, usualmente a través de pruebas t.

Dentro de los primeros materiales de referencia producidos de plaguicidas en matriz se encuentran los producidos por JRC y correspondieron a materiales de plaguicidas organoclorados en leche en polvo y alimento animal certificados a través de estudios interlaboratorio. Para el caso de los materiales de leche en polvo [47], la homogeneidad fue evaluada para nueve plaguicidas organoclorados presentes en dos lotes de leche (natural y fortificada), los resultados mostraron coeficientes de variación entre 2,6 % y 8,4% para dieldrina y b-HCH, respectivamente para la leche fortificada y, para el caso de la leche natural se obtuvieron coeficientes entre 4% y 6,5% para DDE y HCB , respectivamente. En el segundo caso (alimento animal) [46], los resultados mostraron que los coeficientes de variación obtenidos durante la evaluación de homogeneidad entre las unidades estuvieron entre 2,7 % y 7,3% para $\gamma$-HCH y $\gamma$-clordano, respectivamente. Mientras que los coeficientes de variación obtenidos por la variación entre unidades oscilaron entre 2,8% y 3,9% para heptacloro y dieldrina, respectivamente. La estabilidad fue evaluada a tres temperaturas -20 ºC, 20 ºC y 37 ºC. Después de uno, tres, seis y, 12 meses, una muestra fue analizada para determinar el contenido de cada plaguicida, comparándolo frente a las unidades de referencia (almacenadas a -20 ºC). Compuestos como $\alpha$-HCH, $\gamma$-HCH, heptacloro y DDT, presentaron un decrecimiento significativo en su contenido cuando fueron expuestos a 37 ºC. Teniendo en cuenta los resultados, se concluyó que el material debía ser almacenado a temperaturas inferiores a 20 ºC durante 12 meses. Sin embargo, en estudios de monitoreo realizados posteriores a la certificación, se encontró que el DDT mostró un decrecimiento en su concentración por lo que se generó una modificación en el valor certificado.

Isoprotiolano, etofenprox, fenitrotión fueron plaguicidas incluidos dentro del desarrollo del material de arroz integral producido por NIMJ [41], la certificación de este material se llevó a cabo a través del uso de técnicas cromatográficas como cromatografía líquida y de gases aplicando dilución isotópica. Los resultados del estudio de estabilidad a corto plazo, mostraron una disminución significativa de la concentración del isoprotiolano, razón por la que excluyeron este compuesto de la certificación. En el caso de etofenprox y fenitrotión, no hubo cambio significativo en la concentración de los analitos durante el estudio. Los resultados de la evaluación de la homogeneidad mostraron que el material tuvo una incertidumbre debida a la heterogeneidad entre las unidades de 2,3% y 1,6% para

etofenprox y fenitrotión, respectivamente. Finalmente, se certificaron dos plaguicidas en un material de arroz integral. Los valores certificados y sus incertidumbres (k=2) fueron de 0,19 mg/kg ± 0,05 mg/kg para etofenprox y 0,109 mg/kg ± 0,017 mg/kg para fenitrotión.

Un material de referencia certificado de PCBs y plaguicidas organoclorados en pescado (nonacloro, dieldrina, DDE, DDT y DDD), fue desarrollado y caracterizado por Otaki, et al., [40]. La evaluación de la homogeneidad de este material se realizó a través de la cuantificación de los analitos de interés a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS, de sus siglas en inglés). Para el caso de los plaguicidas solamente se evaluó la homogeneidad de un compuesto, el DDE y su incertidumbre fue asociada a los demás plaguicidas. El valor de incertidumbre debida a la heterogeneidad obtenida para este compuesto fue de 0,41%. Las incertidumbres obtenidas para cada analito de este material, fueron obtenidas a partir de la combinación de incertidumbres asociadas a la homogeneidad y la caracterización; en todos los casos la incertidumbre expandida (k=2) fue ≤10%. Es de resaltar que en el presupuesto de incertidumbre no se consideraron fuentes debidas a la posible inestabilidad del material.

Saldanha, et al., [33], publicaron un estudio de viabilidad para la producción de materiales de referencia de 11 plaguicidas (forato, promizamida, vinclozolina, diazinón, metil-clorpirifos, metalaxilo, metil-prifimifós, clorpirifós, paratión, bromopropilato y permetrina) a concentraciones cercanas a los LMR en alimento para bebé a base de zanahoria y papa. Para la evaluación de la homogeneidad del material fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se empleó ANOVA para determinar las variaciones entre y dentro de las unidades, acorde con Lisinger et al.,[11]. Los estudios de estabilidad del material se realizaron a temperaturas de -20 °C, 4 °C y 18 °C; la temperatura de referencia fue -70 ° C. Los tiempos de almacenamiento 4 semanas (estudio de estabilidad a corto plazo) y 5 meses (estudio de estabilidad a medio plazo). Las mediciones se realizaron en condiciones de repetibilidad a través de GC-MS. Se verificaron los datos en busca de valores atípicos mediante la prueba de Grubbs y se realizó un análisis de regresión lineal en función del tiempo. Finalmente, la incertidumbre de estabilidad se calculó para un período de 1 semana (corto plazo) y 5 meses (mediano plazo). Los resultados mostraron que, todos los analitos en estudio presentaron incertidumbres debidas a la heterogeneidad entre botellas <7%. Los resultados del estudio de estabilidad mostraron que a -20 ºC todos los compuestos fueron estables, sin embargo el bromopropilato y la permetrina presentaron una tendencia positiva lo cual se atribuyó a razones netamente instrumentales. A 4 ºC en el estudio de corto plazo,

se presentó una notable disminución de la concentración del forato y la permetrina, indicando una degradación sustancial de estos compuestos. En el estudio de mediano de plazo, seis plaguicidas más de los 11 evaluados presentaron una degradación significativa al ser almacenados durante cinco meses, mientras que compuestos como metalaxilo y clorpirifos, fueron los únicos que se mantuvieron estables durante 4 semanas almacenados a 18 ºC y finalmente, solo el metalaxilo fue estable siendo almacenado bajo estas condiciones.

Otake et al.,[37], evaluaron la homogeneidad de materiales de plaguicidas organoclorados y piretroides en cebolla y repollo, para ello, se realizó la cuantificación de los analitos de interés a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas empleando dilución isotópica (GC-IDMS). Se obtuvieron incertidumbres debidas a la heterogeneidad de los materiales entre 0,49% y 1,69%, para etofenprox en cebolla y fenitrotión en repollo, respectivamente. Para estos materiales se evaluó la estabilidad a corto plazo a tres temperaturas: 15 ºC, 10 ºC y 0 ºC. La concentración de cada plaguicida fue monitoreada antes y después del transporte. La estabilidad a largo plazo, fue evaluada, a través del monitoreo del la concentración de cada plaguicida durante un año. Para ello, las botellas fueron almacenadas a una temperatura aproximada de -30 ºC en la oscuridad. Los resultados de corto plazo, mostraron que los analitos se mantuvieron estables únicamente transportados a temperaturas ≤0 ºC, por lo que no se consideró un aporte a la incertidumbre debido a la estabilidad de corto plazo. Por su parte, los resultados del estudio de estabilidad a largo plazo, no mostraron disminución significativa para la concentración de los plaguicidas en estudio en ambas matrices. Sin embargo, la concentración del etofenprox tuvo una disminución de cerca del 17%, respecto a su concentración inicial. Se reportó que esta disminución pudo deberse a reacciones de hidrólisis; por lo que el analito fue removido de la certificación . Las incertidumbres obtenidas debidas a la estabilidad a largo plazo estuvieron entre 2,7% para fenitrotión y 11% para cipermetrina en cebolla y para el caso del material de repollo se obtuvieron incertidumbres entre 5,5% y 17% para permetrina y clorpirifós, respectivamente. Finalmente, se obtuvieron incertidumbres expandidas con un factor de cobertura de k=2, para un nivel de confianza de 95%, las cuales se encontraron entre 6,58% y 22,86% para fenitrotión y cipermetrina en cebolla y entre 11,83% y 34,78% para permetrina y clorpirifos en repollo, respectivamente, de las

incertidumbres reportadas, la fuente de mayor aporte a incertidumbre fue la estabilidad a largo plazo.

Ahn et al., [49] publicaron los resultados del monitoreo de la estabilidad del material de plaguicidas en repollo, producido por el Instituto de Investigación de Estándares y Ciencia de Corea (KRISS, de sus siglas en inglés), el cual fue fortificado con cuatro plaguicidas: diazinón, clorpirifos (organofosforados) y ($\alpha$+$\beta$)-endosulfán (organoclorados). El material fue almacenado a -70 ºC (temperatura de referencia) y se evaluaron temperaturas de -20 ºC y 4 ºC por un periodo de 6, 18 y 30 meses. Se concluyó que el material conservó los valores certificados siempre y cuando se almacenara a una temperatura de -20 ºC, para todos los analitos evaluados, siendo coherentes con investigaciones previas en esta matriz.

Sin et al., [44] desarrollaron un material de referencia de cipermetrina en té verde. La evaluación de estabilidad a largo plazo se evaluó a intervalos regulares durante un periodo de 12 meses a temperatura ambiente y, el estudio de corto plazo se realizó evaluando una temperatura de 37 ºC por un periodo de dos meses, las mediciones se realizaron a través de cromatografía de gases con detector de captura electrónica (GC-ECD, por sus siglas en inglés). Los resultados mostraron que el material presentó una homogeneidad adecuada, la incertidumbre debida a esta componente fue de 1,6 %. Por su parte, las incertidumbres obtenidas para la estabilidad del material fueron de 1,7 % y 2,9% para largo y corto plazo, respectivamente. Finalmente, el material fue certificado con un valor certificado e incertidumbre (k=2) de 148 $\mu$g/kg ± 14 $\mu$g/kg

El Instituto Nacional de Metrología de Japón, desarrolló un material de plaguicidas organofosforados en manzana [38], el estudio de homogeneidad se realizó cuantificando cada uno de los plaguicidas bajo condiciones de repetibilidad. El estudio de estabilidad se llevó a cabo monitoreando la estabilidad del material durante un año almacenado a -30 ºC en la oscuridad. Las mediciones se realizaron empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se obtuvieron incertidumbres debidas a la heterogeneidad del material entre 4% y 6,8%, para diazinón y permetrina, respectivamente. Los resultados del estudio de estabilidad mostraron que no existió disminución estadísticamente significativa de la concentración de los analitos objetivo durante el periodo de almacenamiento (32 meses), las incertidumbres obtenidas fueron de

17,3% para diazinón, 11,5% para fenitrotión, 25% para cipermetrina y 10,3% para permetrina. Las incertidumbres expandidas (k=2) para los plaguicidas certificados fueron de: 35,96 % para diazinón, 25,16 % para fenitrotión, 52,26% para cipermetrina y 24,91% para permetrina. Finalmente, se concluyó que la incertidumbre debida a la estabilidad de largo plazo fue la fuente que aportó mayoritariamente en el presupuesto de incertidumbre de los materiales.

Otro material desarrollado por NIMJ corresponde al material de plaguicidas en soya [39], certificado a valores muy cercanos a los límites máximos de residuos (LMR), los estudios de homogeneidad y estabilidad se realizaron acorde con previas investigaciones [37], [38]. Los resultados de la evaluación de la homogeneidad presentaron incertidumbres entre 1,89% para diazinón y 4% para fenitrotión. Por su parte, la estabilidad a largo plazo del material se evaluó bajo condiciones de almacenamiento (-80 ºC) durante 55 meses, mostrando que no existe degradación significativa en la concentración de los analitos. Se estimaron las incertidumbres debidas a la estabilidad a largo plazo obteniendo valores de: 6,65% para diazinón, 10,30% para fenitrotión, 11,5% para clorpirifós y 7,65% para permetrina. Durante esta investigación se concluyó que el almacenamiento a -80 ºC, podría resultar poco práctico para los usuarios, por lo que se evaluó también la estabilidad del material almacenado a -30 ºC, obteniendo que el material era estable bajo estas condiciones durante un periodo de 3 meses, tiempo que se otorgó de vigencia al material después de la compra. Finalmente, los valores certificados y las incertidumbres expandidas del material fueron: 21,7 mg/kg $\pm$ 3,2 mg/kg para diazinón, 88 $\mu$g/kg $\pm$ 21 $\mu$g/kg para fenitrotión, 11,1 mg/kg $\pm$ 3,2 mg/kg para clorpirifos y 20,1 $\pm$ 4,3 mg/kg para permetrina.

Por su parte, Grimalt et al., [32],[43], desarrollaron un material de referencia de plaguicidas en pepino a partir de la fortificación de la matriz con 15 plaguicidas de interés: acetamiprid, axozistrobina, carbendazim, clorpirifós, cipermetrina, diazinón, ($\alpha$+$\beta$)-endosulfán, fenitrotión, imazalil, imidaclorpid, iprodione, malatión, metomil, tebuconazol y tiabendazol. Estudios de homogeneidad y estabilidad fueron llevados a cabos para determinar la viabilidad del material. La homogeneidad del material se evaluó a través cromatografía de gases y cromatografía líquida. En ambos casos se realizaron las mediciones bajo condiciones de repetibilidad de manera aleatoria. La incertidumbre debida a la heterogeneidad del material fue estimada acorde con Lisinger et al., [11]. El estudio de

estabilidad se realizó a través de un diseño isócrono durante un periodo de 9 semanas, se estudiaron temperaturas de -20 ºC, 4 ºC y 18 ºC, durante 0, 3, 6 y, 9 semanas, siendo – 70 ºC la temperatura de referencia. Para cada unidad se realizaron dos réplicas independientes analizadas por cromatografía de gases y líquida en condiciones de repetibilidad. Se probó la significancia de las pendientes mediante una prueba t. Finalmente, se obtuvieron incertidumbres debidas a la homogeneidad del material entre 0,8% y 51,5%, para azoxistrobina y ($\alpha$+$\beta$)-endosulfán, respectivamente; la alta incertidumbre obtenida para ($\alpha$+$\beta$)-endosulfán se atribuyó a la variación instrumental más que a la homogeneidad del analito en el material. En el estudio de estabilidad se obtuvo que las pendientes no fueron significativamente diferentes de cero a -20 ° C para la mayoría de los analitos, excepto para el (α+β)endosulfán y el fenitrotión, que mostraron una tendencia negativa que fue significativa, probablemente como consecuencia de la estabilidad limitada a -20 °C. En el caso de la azoxistrobina a -20 °C, se observó una tendencia positiva, aunque la diferencia entre los valores máximos y mínimos se mantuvo dentro de la incertidumbre del procedimiento analítico. A 4 °C, cinco de los 15 pesticidas mostraron pendientes negativas, lo que sugiere una inestabilidad a esta temperatura durante las nueve semanas. El efecto es aún más evidente a 18 °C, donde prácticamente todos los plaguicidas mostraron inestabilidad durante el mismo período. Por lo tanto, el material enriquecido debe almacenarse en condiciones de congelación (-20 a -70 °C).

Sin et al., [45], publicaron un estudio acerca de un material de referencia certificado en el contenido de a-endosulfán, b-endosulfán y sulfato de endosulfán en té. El estudio de estabilidad a largo plazo se llevó a cabo a través de un diseño clásico exponiendo el material a condiciones de almacenamiento (20 °C), los resultados obtenidos en cada tiempo 1, 3, 6 y 12 meses, respectivamente, se compararon con los resultados medios de las muestras almacenadas a la temperatura de referencia de -18 ° C. Para el estudio de estabilidad a corto plazo se adoptó un enfoque isócrono, en el que todas las mediciones se realizaron en condiciones de repetibilidad, se utilizó para evaluar el efecto del almacenamiento a una temperatura elevada de 30 ° C. Los resultados obtenidos para las muestras almacenadas a 30 °C durante 1, 2 y 4 semanas, respectivamente, se compararon con los resultados medios de las muestras almacenadas a la temperatura de referencia de −18 ° C durante el período de estudio de estabilidad de 4 semanas. Todas las mediciones fueron realizadas a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

empleando ionización química negativa (GC-NCI-MS, de sus siglas en inglés). Los resultados de la homogeneidad presentaron incertidumbres inferiores al 1% para los tres analitos evaluados y, las incertidumbres debidas a la estabilidad a corto y largo plazo fueron inferiores a 0,7% y 1,6%, respectivamente. La incertidumbre final del material fue de 7,8 % para $\alpha$-endosulfán y 6,6 % para $\beta$-endosulfán y el sulfato de endosulfán. Se concluyó que el material podría ser almacenado por un periodo de hasta 12 meses a una temperatura máxima de 20 ºC.

Finalmente, para el caso de soluciones de calibración no se han encontrado muchas publicaciones de estudios de homogeneidad y estabilidad en materiales de referencia. Sin embargo, se han publicado recientemente certificados de materiales de referencia certificados de plaguicidas organoclorados en hexano e isooctano los cuales fueron producidos por NIST [31],[34]. Y aunque los certificados no detallan información acerca del desarrollo de estos estudios se reportan los tiempos de vigencias y las condiciones de almacenamiento los cuales corresponden a un tiempo máximo de 10 años almacenados a unas temperaturas entre 10 ºC y 30 ºC y, en ambos casos ha sufrido varios cambios en los certificados debido a la inestabilidad de algunos compuestos, la cual fue observada durante los estudios de monitoreo. El DDD y el aldrin fueron removidos de la certificación del material en hexano y la endrina del material en isooctano.

### 1.2.3 Uso de estrategias de estabilización sobre materiales en matriz

Como se mencionó anteriormente, una de las principales causas de la limitada oferta de los materiales de referencia es la susceptibilidad a la degradación de algunos analitos o las matrices, lo cual usualmente sucede durante los procesos de producción o durante el almacenamiento generando que: las propiedades no sean certificables, que el valor certificado cambie durante su periodo de vigencia, que se requieran condiciones extremas de almacenamiento (difíciles para los usuarios) o, que se certifiquen materiales con una limitada vida útil. En este sentido, diferentes investigaciones con el fin de evaluar la viabilidad de la producción siendo uno de los principales objetivos su preservación se han realizado. A continuación, se presentan algunas de estas investigaciones.

Para evitar la degradación de los materiales durante los procesos de producción, se han empleado diferentes procedimientos de deshidratación como liofilización, secado por aspersión e incluso ambos tratamientos de manera simultánea [30]. Estos procesos tienen la ventaja de contribuir con la obtención de sólidos usualmente homogéneos y al disminuir el contenido de agua se protegería el material de reacciones oxidativas, proteolíticas y se ralentizarían los procesos de actividad biológica. Sin embargo, es de tener en cuenta que: dependiendo de la matriz el material puede ser altamente higroscópico y en algunos casos difícil de manipular, el secado por aspersión requiere altas temperaturas lo cual puede afectar los analitos termolabiles y no puede ser aplicado a todo tipo de materiales y, la liofilización por su parte es un proceso que si bien se realiza a bajas temperaturas, es relativamente largo lo cual puede afectar analitos sensibles [50].

A pesar de tener algunas desventajas, el proceso de liofilización ha sido ampliamente usado por su aplicabilidad en la producción de materiales de naturaleza orgánica, inorgánica y biológica en diferentes matrices[51]–[57]. En el caso de la producción de materiales de plaguicidas, Saldanha et al., [33] y Grimalt et al. [32] compararon dos procesos de producción de plaguicidas en alimento para bebé y pepino, respectivamente. Materiales congelados (frescos) y materiales liofilizados, fueron evaluados. Ambos estudios reportaron homogeneidad adecuada, sin embargo, no se presentó una mejora significativa de la estabilidad en los materiales sometidos a secado. De hecho, las mayores pérdidas de analito se presentaron en los materiales liofilizados, pero fueron atribuidas como inherentes al proceso de secado, por lo que se recomendó fortificar con una mayor cantidad de los plaguicidas para compensar las pérdidas. Por otra parte, materiales producidos en pescado y manzana han reportado superioridad en términos de estabilidad y fácil manipulación, atribuidos al secado del material [38], [40], [48]. Kim et al. [58] concluyeron que al disminuir en un 99,7% el contenido de agua en un material de repollo se puede reducir la microdegradación de los plaguicidas, en este estudio se obtuvo que la mayoría de los plaguicidas evaluados se mantenían estables incluso si se mantenían a temperatura ambiente por algunos días.

Por otra parte, y con el fin de disminuir la actividad microbiológica e inhibir el crecimiento de microorganismos en los materiales de referencia, se emplean mecanismos de esterilización usualmente térmicos, o a través del uso de radiación-$\gamma$ o UV. La selección del mecanismo requiere especial atención, ya que las altas temperaturas pueden derivar

en alteraciones de la matriz e incluso la destrucción del analito y, en el caso de la irradiación es muy importante que se defina la correcta intensidad ya que una intensidad muy baja puede ser insuficiente y una intensidad muy alta puede destruir el material. En este contexto, Sejeroe-Olsen et al,. [59], evaluaron el efecto de la liofilización y la esterilización mediante alta temperatura (autoclavado a 121 ºC) sobre un material de contaminantes orgánicos presentes en compotas, encontrándose que la estabilidad del material mejoró con el proceso de liofilización respecto al material fresco, pero que para el 25% de los compuestos evaluados el proceso de autoclavado afecto negativamente su estabilidad. Faure et al.,[50] reportan que la irradiación se ha aplicado con éxito en materiales de micotoxinas en cereales, pero ha destruido por completo plaguicidas organoclorados en alimento animal, por su parte Violante et al., [52] evaluaron tres niveles de radiación encontrando que en ningún caso se vio afectado el valor del antibiótico evaluado; otras publicaciones tampoco reportaron afectación de los compuestos debida a la radiación aplicada [44], [48], [55].

Los aditivos son otra forma de mejorar la estabilidad de los materiales. El antioxidante etoxiquina se ha utilizado en la preparación de MRC de tejido de mejillón para biotoxinas marinas [60] y también en el MRC de pescado para compuestos organoclorados [61]. El butilhidroxitolueno (BTH) y el butilhidroxyanisol (BHA), otros antioxidantes se han utilizado en la preparación de MR de compuestos orgánicos en tejidos grasos [62]. Por su parte, McCarron et al,. [51] emplearon antioxidantes y antibióticos de manera separada y simultáneamente, econtrándose que una mayor estabilidad del compuesto evaluado se presentó cuando se emplearon los aditivos de manera simultánea. De acuerdo con Kielbasa et al,. [63] otros aditivos han sido usados en materiales de referencia los cuales incluyen anticoagulantes, antioxidantes y conservantes como: EDTA, gentamicina, azida de sodio y benzamidina de sodio, los cuales fueron empleados principalmente en matrices biológicas como sangre, hígado y proteínas. Sin embargo, aunque se hace referencia al uso de aditivos en algunas preparaciones, hay poca información disponible sobre su efectividad.

### 1.2.4 Uso de estrategias de estabilización aplicadas a materiales de alta pureza

La volatilidad de los solventes en los que usualmente se preparan los materiales de referencia de analitos orgánicos puede comprometer la estabilidad del material, por lo que los productores han optado por usar ampollas de vidrio para mitigar este efecto [27], [64]. En general, para este tipo de materiales no se encontraron publicaciones que detallen estrategias empleadas para el incremento de la estabilidad, lo cual se atribuye a que la mayoría de los materiales disponibles son de moléculas muy estables. Sin embargo, se encontraron algunas referencias sobre el estudio de la influencia del solvente empleado en las preparaciones de plaguicidas y el uso de aditivos en la estabilidad.

Bernal et al. [65] evaluaron la influencia del uso de metanol y hexano como solventes de preparación, sobre la estabilidad de soluciones de acaricidas como bromopropilato, coumafós, amitraz y clordimeformo. Se encontró que bromopropilato, coumafós y clordimeformo presentaron degradación, de hasta un 10% cuando fueron preparados en metanol y almacenados en refrigeración, en ningún caso se presentaron productos de degradación detectables. Por su parte, el amitraz presentó degradación desde su preparación, y en 10 días ya había disminuido su concentración en un 90%, durante su análisis se detectaron productos de degradación y se reportó que su estabilidad no mejoró al mantenerse en oscuridad ni a bajas temperaturas. Cuando las soluciones fueron preparadas en hexano, no se presentó degradación de los compuestos y en el caso del amitraz se incrementó la estabilidad notoriamente. Los resultados se atribuyeron principalmente a las propiedades hidrolíticas del metanol.

Mastovska et al., [66] publicaron un estudio en el que evaluaron la estabilidad de plaguicidas en seis solventes orgánicos comúnmente usados en su análisis. En este estudio se encontró que los solventes de menor polaridad como el isooctano, hexano y tolueno (usados como solventes para la determinación instrumental por GC) fueron superiores que otros solventes como el acetonitrilo (usado para la extracción de los analitos), ya que en este último se reportó la degradación de plaguicidas N-trihalometano como captan, folpet y diclofluanid. Para incrementar la estabilidad de estos analitos se evaluó el uso de ácido acético (0,1%) para acidificar el medio, lo cual mejoró notablemente la estabilidad de estos analitos, además de otros como difocol y clorotalonilo. También se

encontró que estos dos últimos analitos fueron inestables en acetona y, los plaguicidas con grupos tioéter (fentión y disulfotón) se degradaron en acetato de etilo. Se observó la generación de isómeros de piretroides como deltametrina y cihalotrina, sin embargo, su inestabilidad fue atribuida a procesos instrumentales. Finalmente, se concluyó que el acetonitrilo acidificado es un solvente que permite mantener la estabilidad de la mayoría de los analitos, incluso los más problemáticos.

Sharma et al., estudiaron la estabilidad de 89 de plaguicidas almacenados a -25 °C y encontraron que más del 96% de estos permanecieron estables respecto a su fecha de vencimiento. Por otro lado, encontraron que una vez caducan estos materiales la variación de su composición es inferior al 7%, incluso después de cuatro años. [67]

### 1.2.5 Aditivos aplicados para la estabilización de materiales de referencia en matriz

Hasta la fecha, sólo existe un reporte en el cual se realizó un estudios de estabilización de plaguicidas en matrices de alimentos. Bian et al, investigaron la influencia de algunos aditivos sobre la estabilidad de plaguicidas organofosforados en muestras de pepino liofilizado. Dentro de los aditivos evaluados se encontraban iones métalicos, antioxidantes, inhibidores de enzimas y disolventes orgánicos. En este estudio, se encontró que los iones metálicos, incluidos $Al^{+3}$, $Fe^{+3}$ y $Co^{+2,}$ aumentaron la estabilidad del diclorvos, malatión y clorpirifos. [68]

### 1.2.6 Encapsulados empleados como estrategia de estabilización

Respecto al uso de encapsulados para la preparación de materiales de referencia no se han encontrado estudios publicados. Sin embargo, algunas industrias de agroquímicos como BASF, Bayer, Altria, DuPont, entre otras, han desarrollado nuevas formulaciones de plaguicidas que buscan reducir la dosis del ingrediente activo y lograr una menor residualidad de estos compuestos en los alimentos y el medioambiente. Dentro de estas nuevas formulaciones se han empleado técnicas de micro y nano encapsulación con el propósito de proteger los ingredientes activos o liberarlos bajo ciertas condiciones, por ejemplo: luz solar, humedad, acidez, entre otras.[69]

Nuruzzaman et al., [70] reportaron que la estabilidad de ciertos plaguicidas nanoencapsulados incrementó considerablemente comparada con la estabilidad de los

plaguicidas en formulaciones convencionales cuando eran almacenados durante largos periodos. Wang et al,.[71] y Song et al,. [72] evaluaron la estabilidad de plaguicidas de baja solubilidad en agua como la cipermetrina y el triazofos, respectivamente. En ambos casos se estudió la formación de nanoemulsiones para favorecer la liberación de los plaguicidas y su influencia sobre la estabilidad. Igualmente, se evaluó la susceptibilidad del triazofós a sufrir reacciones de hidrólisis, para ello se estudió su comportamiento en soluciones tamponadas de pH 3, 6 y 9. Los resultados mostraron que el triazofós era estable a pH inferiores o iguales a 7, pero se hidrolizaba fácilmente en pH mayores. La estabilidad de los compuestos se vio favorecida al ser incorporados en la nanoemulsión al inhibir la hidrólisis incluso en pH mayores a 7. Por su parte, Zhang et al,. [73] investigaron el uso de goma arábiga y goma xantano sobre la estabilidad de la avermicina, observando que la adición de goma arábiga tuvo una influencia significativa sobre su estabilidad, mientras que la adición de goma xantano afectó de manera negativa su estabilidad.

# 2. Empleo de estrategias para la estabilización de materiales de referencia en soluciones calibrantes

Este capítulo presenta los resultados obtenidos en la estabilización de materiales de referencia de plaguicidas en soluciones calibrantes mediante el uso de aditivos. En primer lugar, se presenta el desarrollo y validación de las metodologías analíticas empleadas para la evaluación de la estabilidad de los materiales, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En segundo lugar, se describen los resultados obtenidos en la producción de los materiales de referencia y, el efecto de los diferentes tratamientos, dentro de los que se encontraban: (i) ambiente oxidativo, (ii) atmósfera inerte y, (iii) adición de ácido fórmico y atmósfera inerte. Finalmente, se presentan los resultados de los estudios de estabilidad que permiten evidenciar los procesos de degradación de los compuestos y el impacto de los tratamientos aplicados.

## 2.1 Introducción

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), define los plaguicidas como sustancias o mezclas de sustancias químicas o biológicas destinadas a repeler, prevenir y controlar cualquier plaga o enfermedad, que pueda afectar los cultivos [74]. Si bien su aplicación es mundialmente regulada debido a los riesgos que algunos plaguicidas pueden representar para el ambiente, salud humana y animal, su uso es indispensable para asegurar la protección y sostenibilidad de los cultivos, y con ello la producción de alimentos, ya que se estima que sin la aplicación de plaguicidas la producción de frutas, vegetales, forrajes y fibras puede disminuir hasta en un 40 % debido a la acción de diversas plagas y enfermedades [75].

En este contexto, el control y la medición de agroquímicos es fundamental, pues su concentración, es una variable de gran importancia para el establecimiento de los tiempos de carencia, la dosificación, la eficacia del agroquímico, la evaluación de la conformidad, entre otros. Por lo anterior, los laboratorios analíticos juegan un papel muy importante en la conformidad de estos productos, por lo que deben emplear diferentes herramientas de aseguramiento de la calidad, con el fin de proveer evidencia objetiva acerca de su competencia técnica y la confiabilidad de los resultados. Esto, derivado del hecho que muchas decisiones técnicas, económicas y políticas se basan en los resultados de las mediciones analíticas. Por ello, es necesario un adecuado sistema de control de calidad y de aseguramiento de los resultados; para lograr este objetivo, los materiales de referencia (MR) juegan un papel muy importante, ya que su adecuado uso permite no solo obtener resultados confiables si no también comparables. Es decir, permite generar un vinculo que asegura que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios o en diferentes tiempos sean equivalentes [76].

Antes de proveer un material de referencia, los productores deben evaluar su homogeneidad y estabilidad, de manera que puedan asegurar que el o los valores de la propiedad se mantienen dentro de la incertidumbre declarada entre las diferentes unidades producidas y durante el tiempo de transporte y vida útil. En general, la estabilidad de los materiales es la característica que más limita su oferta [2], especialmente porque muchos analitos pueden sufrir procesos de degradación durante su transporte o almacenamiento, haciendo que su valor no se pueda certificar, que tenga periodos de validez muy cortos o

que requieran condiciones extremas de transporte y almacenamiento, siendo imprácticos para los laboratorios. Por otro lado, para evaluar esta estabilidad y homogeneidad de MR, es indispensable contar con metodologías suficientemente precisas de modo que, si se identifican diferencias en el material o cambios en el tiempo, puedan ser atribuidos a variaciones en el material y no a variaciones de la medición.

En este contexto, y reconociendo la importancia de contar con materiales de referencia de plaguicidas que soporte la calibración analítica y la trazabilidad metrológica, el presente capítulo centra su atención inicialmente, en el desarrollo y validación de metodologías que permitan la evaluación de la estabilidad de candidatos a materiales de referencia ( soluciones de calibración); posteriormente, se presentan los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados a diferentes materiales de referencia y la aplicación de diferentes estrategias (tratamientos) para su estabilización.

## 2.2 Experimental

### 2.2.1 Reactivos

Los estándares analíticos de plaguicidas empleados durante esta investigación fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer, en todos los casos la pureza reportada por el fabricante fue de mínimo el 98%. Las soluciones madre fueron preparadas a una concentración aproximada de 1000 mg/kg empleando acetonitrilo, metanol o acetato de etilo como solvente. Todos los solventes empleados fueron grado residuos, grado HPLC o grado LC-MS marca Merck. Las soluciones madre se almacenaron a -20 ºC en recipientes ámbar, hasta su uso.

### 2.2.2 Instrumentos y equipos

Todas las preparaciones se llevaron a cabo de manera gravimétrica empleando balanzas analíticas Mettler Toledo XPE504 y XPE204 de resolución mínima de 0,01 mg y una balanza Mettler Toledo XP4002S de resolución de 0,01 g. Las balanzas fueron calibradas por el Instituto Nacional de Metrología y su calibración fue verificada antes de su uso con un juego de pesas clase E2.

Los análisis instrumentales fueron llevados a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A, equipado con un muestreador automático 7693A y un inyector split/splitless operado en modo split, se usaron liners ultra inertes de capacidad de 900 μL. La separación se realizó empleando una columna marca J&W Scientific HP-5MS (5% fenil-95% dimetilpolixiloxano; 30 m, 0,25 mm y d.i. 0,25 mm) usando helio a presión constante como gas de arrastre. Como sistema de detección se empleó un espectrómetro de masas 5890C con impacto electrónico como fuente de ionización, la cual fue operada a 70 eV y 230 ºC, la temperatura del cuadrupolo se mantuvo a 150 ºC y la línea de transferencia se mantuvo mínimo a la temperatura final de la columna en cada método. La adquisición, control del instrumento y análisis de datos fue realizada usando el software MassHunter.

## 2.2.3 Selección de analitos de estudio

Los plaguicidas evaluados durante el estudio corresponden a compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas, estos compuestos fueron seleccionados teniendo en cuenta: (i) la estabilidad reportada en la literatura [77], (ii) el interés del Instituto Nacional de Metrología (iii) la posibilidad de medir en cromatografía de gases y (iv) las cifras de producción o formulación en el país [78]. Los analitos seleccionados para este estudio, se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 2- 1:** Analitos seleccionados para el estudio (estructuras tomadas de [77])

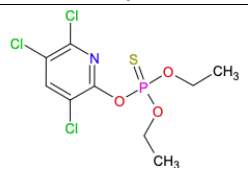
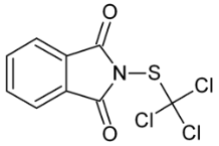
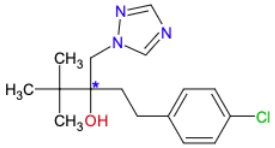
| *Analito* | *CAS* | *Estructura química* | *Familia* | *pKow* |
|---|---|---|---|---|
| Clorpirifos | 2921-88-2 |  | Organofosforado | >4,5 |
| Folpet | 133-07-3 |  | Ftalamida | 0,5-4,5 |
| Tebuconazol | 107534-96-3 |  | Triazol | 0,5-4,5 |

**Tabla 2-1:** (Continuación)

| *Analito* | *CAS* | *Estructura química* | *Familia* | *pKow* |
|---|---|---|---|---|
| Dimetomorf | 110488-70-5 | | Morfolina | 0,5-4,5 |
| 4,4-DDE | 72-55-9 | | Organoclorado | >4,5 |
| Dimetoato | 60-51-5 | | Organofosforado | 0,5-4,5 |
| Azoxistrobina | 131860-33-8 | | Estrobilurina | 0,5-4,5 |
| β-Endosulfán | 33213-65-9 | | Organoclorado | >4,5 |
| Cipermetrina | 52315-07-8 | | Piretroide | >4,5 |
| λ-Cihalotrina | 91465-08-6 | | Piretroide | >4,5 |

**Tabla 2-2:** (Continuación)

| *Analito* | *CAS* | *Estructura química* | *Familia* | *pKow* |
|---|---|---|---|---|
| Difenoconazol | 119446-68-3 | | Triazol | 0,5-4,5 |
| Clordano | 5103-71-9 | | Ciclodieno-organoclorado | >4,5 |
| Bifentrina | 82657-04-3 | | Piretroide | >4,5 |
| Carbofurano | 1563-66-2 | | N-metil carbamato | 0,5-4,5 |

## 2.2.4 Tratamientos estudiados

Se evaluaron tres tratamientos con el propósito de estudiar sus efectos sobre la estabilidad de los plaguicidas en los materiales de referencia. Para realizar este estudio fue necesario producir lotes[1] de los diferentes materiales de referencia (ver numeral 2.2.5), a cada lote se le aplicó el respectivo tratamiento. Los cuales correspondieron a: (i) ambiente oxidativo,

[1] Cada lote contenía aproximadamente 8 mL del material de referencia en ampollas de aproximadamente 10 mL.

para ello una primera porción de cada MR fue envasada en ampollas de mayor capacidad (50 mL) con el fin de incrementar el espacio de cabeza y con ello, favorecer un ambiente oxidativo, (ii) atmósfera inerte, para ello, las ampollas de la segunda porción de cada MR fueron saturadas con argón, con el fin de desplazar el aire y disminuir la posibilidad de oxidación de los compuestos en estudio y, (iii) adición de ácido fórmico y atmósfera inerte, para lo cual la tercera porción de cada MR fue adicionado con ácido fórmico al 0,1% (p/p) para evaluar la degradación de plaguicidas sensibles al pH y, posteriormente saturada con argón para evitar la oxidación de los compuestos.

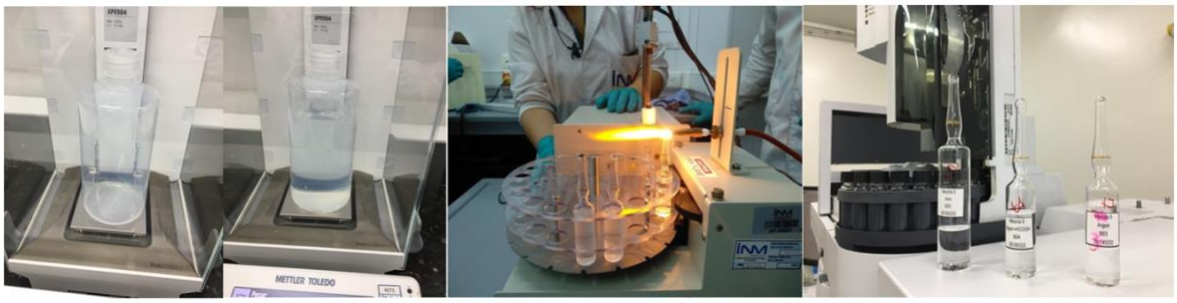
### 2.2.5 Producción de lotes de materiales de referencia

Se prepararon cuatro candidatos a materiales de referencia (MR), cada uno de los cuales corresponde a una mezcla de tres o cuatro plaguicidas seleccionados para el estudio. La preparación se realizó de manera gravimétrica a una concentración de 50 mg/kg. En cada material se adicionó un bifenilo policlorado (PCB) a una concentración de 20 mg/kg, el cual fue empleado como control. Todos los materiales fueron preparados en acetonitrilo grado LC-MS y se obtuvieron aproximadamente 800 g de cada candidato a MR.

Una vez preparados los cuatro MR, estos fueron agitados mecánicamente para asegurar su homogeneidad, posteriormente cada MR fue dividido en tres porciones y a partir de cada porción se preparó un lote de aproximadamente 15 unidades. Para el proceso de envasado se dispensaron cerca de 8 mL del candidato a MR en ampollas de vidrio con capacidad de 10 mL o 50 mL (tratamiento ii, ver numeral 2.2.4), las cuales fueron enfriadas previamente. Para el sellado se empleó una llama de acetileno/oxígeno, y con el fin de evaluar el adecuado sellado de las ampollas se realizó una verificación de fugas empleando un estufa de vacío operada a temperatura ambiente. La

**Figura 2- 1** resume el proceso de producción de los materiales.

**Figura 2- 1:** Proceso general de producción de los MR




Las siguientes tablas muestran los componentes de cada material de referencia candidato, sus concentraciones expresadas como fracción másica (mg/kg) y la incertidumbre estándar relativa asociada a la preparación gravimétrica de los materiales.

**Tabla 2- 2:** Fracción másica de los componentes del MR 1

| *Analito* | *Fracción másica* (mg/kg) | *Incertidumbre u(%)* |
|---|---|---|
| Clorpirifos | 49,972 | 0,0007 |
| Folpet | 49,572 | 0,0006 |
| Tebuconazol | 50,108 | 0,0006 |
| Cihalotrina | 49,861 | 0,0006 |
| PCB-138 | 19,874 | 0,0014 |

**Tabla 2- 3:** Fracción másica de los componentes del MR 2

| *Analito* | *Fracción másica* (mg/kg) | *Incertidumbre u(%)* |
|---|---|---|
| Carbofurano | 49,934 | 0,0006 |
| Dimetomorf | 49,907 | 0,0006 |
| DDE | 49,875 | 0,0006 |
| Dimetoato | 50,14 | 0,0006 |
| PCB-138 | 19,765 | 0,0014 |

**Tabla 2- 4:** Fracción másica de los componentes del MR 3

| *Analito* | *Fracción másica* (mg/kg) | *Incertidumbre u(%)* |
|---|---|---|
| Cipermetrina | 50,399 | 0,0006 |
| Azoxistrobina | 50,411 | 0,0006 |
| b-Endosulfan | 50,511 | 0,0006 |
| PCB-138 | 19,931 | 0,0014 |

**Tabla 2- 5:** Fracción másica de los componentes del MR 4

| *Analito* | *Fracción másica* (mg/kg) | *Incertidumbre u(%)* |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| Difenoconazol | 50,536 | 0,0006 |
| Clordano | 50,512 | 0,0006 |
| Bifentrina | 50,408 | 0,0007 |
| PCB-138 | 20,027 | 0,0014 |

## 2.2.6 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad fueron llevados a cabo a través de diseños isócronos [8]. Todos los materiales fueron expuestos a condiciones aceleradas (50 ºC) por 59 días, con el fin de favorecer la posibilidad de degradación de los analitos. En los tiempos seleccionados ($t_0$=0, $t_1$=14, $t_2$=24, $t_3$=35 y $t_4$=59 días) las ampollas de cada tratamiento fueron almacenadas a temperatura de referencia (-80 ºC). Al finalizar el tiempo, todas las unidades fueron diluidas gravimétricamente y medidas bajo condiciones de repetibilidad. La estabilidad de los materiales fue evaluada mediante un análisis de regresión lineal y la incertidumbre debida a la estabilidad fue estimada acorde con las recomendaciones de la guía ISO 35 [8].

## 2.2.7 Metodologías analíticas

La determinación de los plaguicidas fue llevada a cabo a través de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). Se desarrolló un método de medición para cada uno de los candidatos a materiales de referencia. Posteriormente, todos los métodos fueron validados con el fin de asegurar que el desempeño era adecuado para el uso previsto. Los parámetros validados incluyeron: (i) selectividad, (ii) linealidad y, (iii) precisión como repetibilidad. Otros parámetros como el límite de detección, la robustez y la precisión en condiciones de precisión intermedia no fueron evaluados, dado que: (i) los métodos son empleados para la medición de soluciones de plaguicidas a alta concentración; (ii) los métodos no contaban con múltiples pasos y condiciones que pudieran alterarse en la rutina y, (iii) los métodos pretenden evaluar de manera relativa el comportamiento de los analitos en las mezclas durante los estudios de estabilidad del material. Igualmente, el sesgo no fue evaluado debido a que se trata de mediciones relativas y no absolutas.

- *Selectividad*

La selectividad de los métodos, se evaluó a través de la medición de blancos de solvente (acetonitrilo y acetato de etilo), con el fin de asegurar que no contenían interferentes que pudieran afectar la determinación de los analitos de interés. Así mismo se evalúo la capacidad del método para determinar cada analito en presencia de los demás componentes de material, para lo cual se prepararon mezclas de los plaguicidas, en ausencia del analito a evaluar. Cada mezcla se midió por triplicado.

- *Linealidad*

La linealidad de los métodos se evaluó a través de la preparación gravimétrica de curvas de calibración de las mezclas en un intervalo entre 1 mg/kg y 30 mg/kg. Se prepararon 15 niveles de concentración para cada mezcla, las cuales fueron medidas por quintuplicado al azar. Se evalúo el ajuste del modelo de regresión lineal simple, a través de análisis de varianza y pruebas t-student para pendiente e intercepto. Adicionalmente, se empleo el análisis de varianza de dos vías, a través del cual se evalúo la falta de ajuste del modelo.

- *Precisión*

La precisión de los métodos fue evaluada bajo condiciones de repetibilidad, para ello tres niveles de concentración fueron gravimétricamente preparados e inyectados siete veces en el instrumento, los resultados fueron expresados como coeficiente de variación (%CV). La homogeneidad de varianzas fue evaluada a través de una prueba de Levene. Finalmente, se estimó la incertidumbre tipo A para cada componente de los materiales.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos durante la validación se realizó empleando el software R [79].

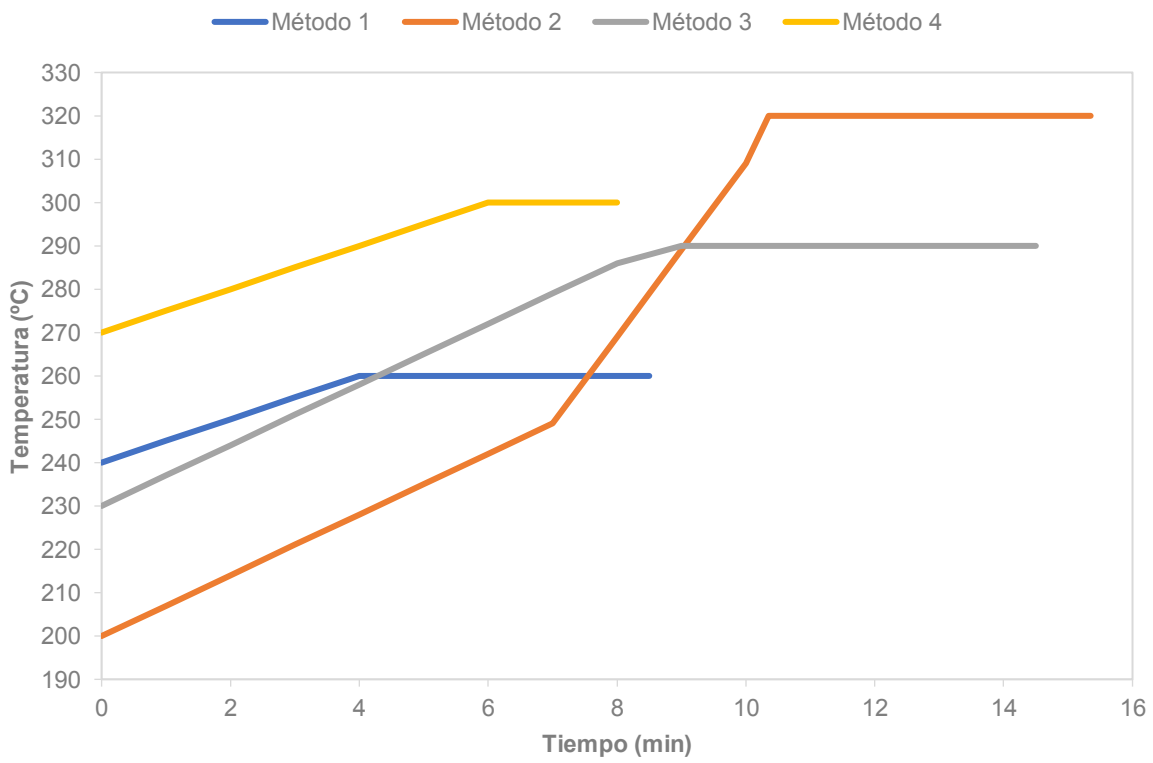
# 2.3 Resultados

## 2.3.1 Desarrollo de los métodos de medición

Para la medición de los plaguicidas en los candidatos a materiales de referencia (MR) se desarrollaron y validaron cuatro métodos de medición (uno para cada mezcla de MR). Para el desarrollo de cada método, se inició con la evaluación de diferentes programas de temperatura con el fin de obtener la separación cromatográfica de los analitos, cada material candidato fue diluido con acetato de etilo a concentraciones entre 2 mg/kg y 15

mg/kg previo a su medición. Para todas las mezclas, fue necesario el empleo de programas de temperatura con el propósito de obtener una adecuada separación cromatográfica. Los métodos desarrollados tuvieron una duración entre 8 min y 14,5 min. La **Figura 2- 2** presenta los programas de temperatura para cada uno de los métodos desarrollados

**Figura 2- 2:** Programa de temperatura en la columna

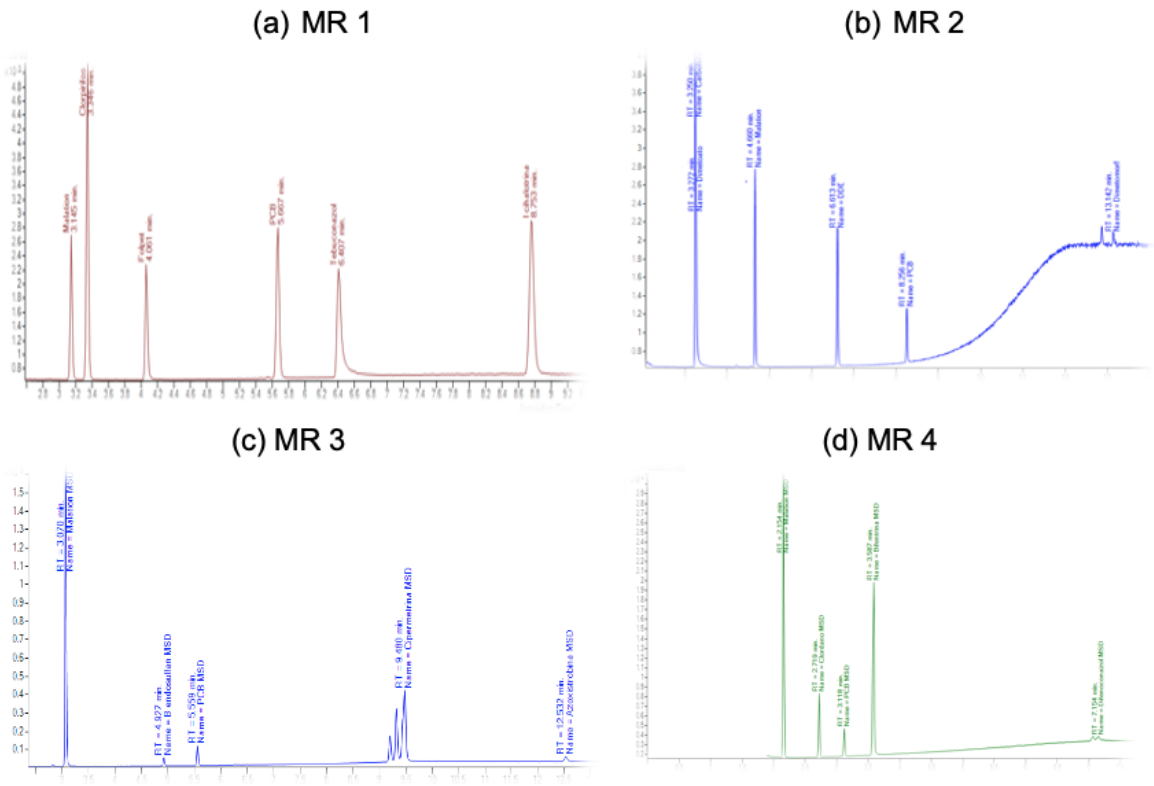



En la **Figura 2- 3**, se presentan los cromatogramas obtenidos para cada material una vez alcanzadas las condiciones adecuadas para el propósito.

Una vez obtenida la separación, se evaluaron diferentes condiciones de inyección con el fin de obtener una precisión como repetibilidad adecuada para el propósito, dentro de estas variables se incluyeron: volumen de inyección, temperatura del inyector, presión en el inyector, presión de pulso, relación de split y tiempo de pulso. Cada parámetro fue evaluado a través de diseños completamente al azar empleando al menos dos niveles, la variable respuesta para la selección de las mejores condiciones correspondió a

coeficientes de variación (%CV) obtenidos de siete réplicas medidas bajo condiciones de repetibilidad de manera aleatoria (n=7).

**Figura 2- 3:** Cromatogramas obtenidos para cada uno de los MR candidatos




Los resultados mostraron que, en general, un volumen de inyección de 0,5 μL permitió obtener coeficientes de variación inferiores para todos los métodos. Igualmente, temperaturas de inyección iguales o mayores a 170 ºC y presiones de 172 kPa, permitieron obtener mayores respuestas y resultados más precisos; así como se evidenció que la aplicación de pulsos de presión entre 310 kPa y 345 kPa durante 0,2 min a 0,6 min permitieron obtener señales con menor ancho de señal, mejor simetría y menores coeficientes de variación, esto atribuido principalmente a que el pulso disminuye el tiempo de residencia de los analitos en el inyector en comparación a una inyección sin pulso, disminuyendo la posibilidad de adsorción y dispersión cromatográfica [80].

A continuación se resumen las condiciones establecidas para cada uno de los métodos de medición desarrollados.

**Tabla 2- 6:** Condiciones de los métodos cromatográficos desarrollados

| *Método* | *Temperatura de inyección (ºC)* | *Presión (kPa)* | *Presión de pulso (kPa)* | *Tiempo de pulso (min)* | *Relación de split* | *Temperatura interfaz (ºC)* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *1* | 200 | 172 | 345 | 0,30 | 20 | 260 |
| *2* | 220 | 172 | 345 | 0,20 | 10 | 320 |
| *3* | 170 | 172 | 345 | 0,60 | 10 | 290 |
| *4* | 240 | 172 | 310 | 0,30 | 20 | 300 |

Algunos compuestos presentes en las mezclas requirieron de una mayor atención durante el desarrollo de los métodos. Para el caso del folpet, temperaturas en el puerto de inyección mayores a 220 ºC generaban la degradación del compuesto impidiendo una determinación precisa, lo cual es concordante con otros estudios [81]. En este sentido, se evaluaron temperaturas entre 160 ºC y 210 ºC, obteniendo mejores resultados para el folpet a 200 ºC, esta temperatura aunque permitió obtener adecuados coeficientes de variación para todos los compuestos de la mezcla, generó una señal cromatográfica un poco más ancha para la λ-cihalotrina en comparación a las señales obtenidas para este compuesto al emplear temperaturas mayores. Por su parte, el tebuconazol y la azoxistrobina, fueron compuestos que presentaron señales altamente asimétricas, las cuales mejoraron notablemente con la aplicación de un pulso de presión, así como su precisión.

A partir de las condiciones presentadas en la **Tabla 2- 6**, se lograron obtener CV< 1,2% para la mayoría los compuestos, excepto para dimetomorf, azoxistrobina y carbofurano, para los cuales se obtuvieron coeficientes de variación de hasta 2,5%. Sin embargo, fueron aceptados teniendo en cuenta que son compuestos de difícil determinación a través de cromatografía de gases.

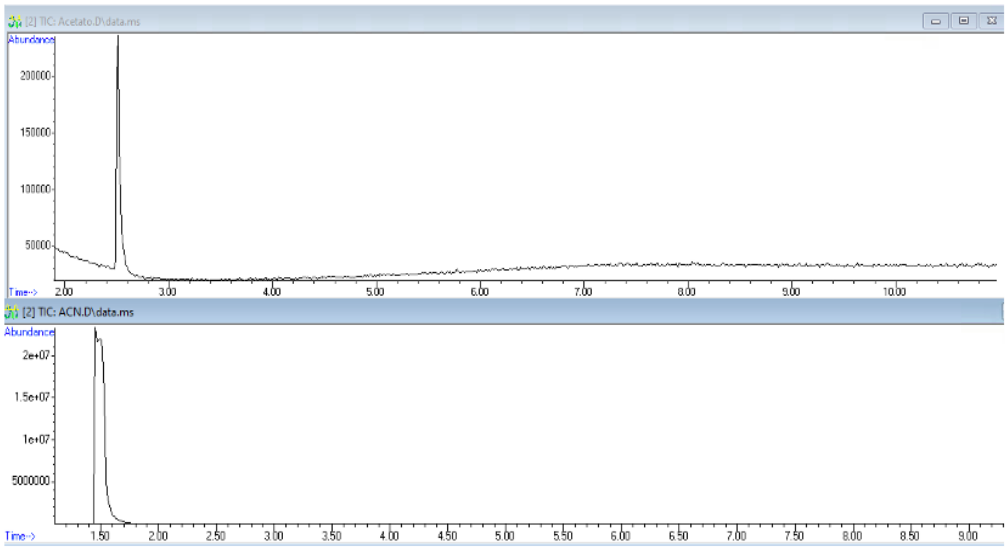
## 2.3.2 Validación de los métodos de medición

Una vez establecidos los cuatro métodos de medición, se procedió a realizar su validación para lo cual se consideraron los parámetros de selectividad, linealidad y precisión en condiciones de repetibilidad. Como se mencionó anteriormente, los demás parámetros no fueron contemplados debido a su poca aplicabilidad para el propósito de la medición. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros mencionados.

- *Selectividad*

Como se puede observar en la **Figura 2- 3**, la resolución entre cada uno de los compuestos es superior a 1,5; por lo cual se puede evidenciar que los métodos desarrollados tienen la capacidad de determinar cada analito de manera independiente. Por otro lado, con el propósito de evaluar si el solvente o alguna impureza del solvente podría interferir sobre la señal cromatográfica de los analitos. Se realizó como complemento del estudio de selectividad, la medición de blancos de acetato de etilo y acetonitrilo, solventes empleados para la preparación de los materiales candidato y sus diluciones. Inicialmente, se realizó la medición de los solventes con el fin de determinar el tiempo de retención de cada uno, evidenciando que en ambos casos se presentaron señales en tiempos de retención inferiores a cualquiera de los tiempos de retención de los compuestos de interés. La **Figura 2- 4** muestra los perfiles cromatográficos correspondientes a cada solvente.

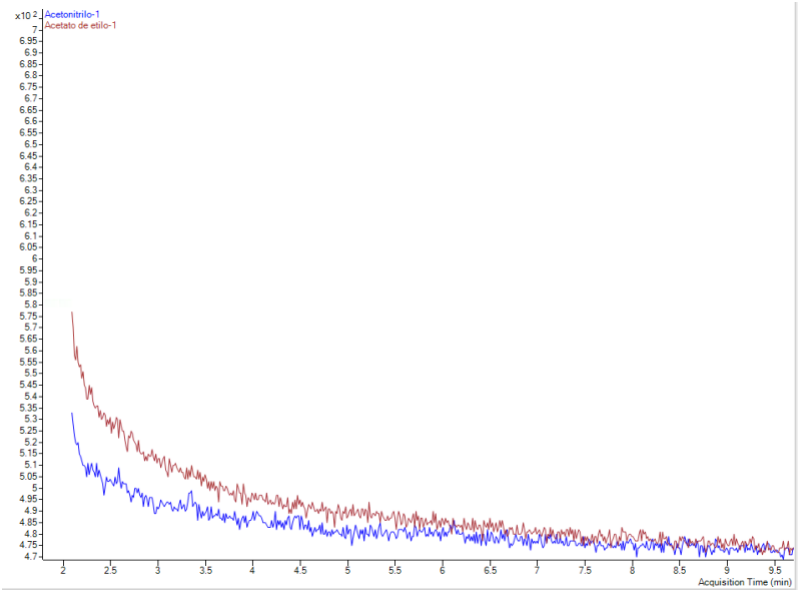
**Figura 2- 4:** Cromatogramas de acetato de etilo (arriba) y acetonitrilo (abajo)




Por otro lado, la

**Figura 2- 5** muestra que al realizar la medición de los blancos a través de cada método se evidenció la ausencia de señales en los tiempos de retención de los compuestos de interés, demostrando que los solventes no presentaron interferencias que pudieran afectar la determinación de los componentes de los materiales candidatos.

**Figura 2- 5:** Cromatogramas obtenidos de los blancos de solvente




Por otro lado, y con el fin de confirmar la capacidad de los métodos de determinar los analitos selectivamente, incluso en presencia de los demás analitos de la mezcla, se realizó la inyección de cada mezcla omitiendo el analito a evaluar (se señala en azul sobre las figuras, el tiempo de retención en el cual debería aparecer el analito). La **Figura 2- 6** y **Figura 2- 7** presentan algunos cromatogramas (TIC) seleccionados correspondientes a esta evaluación.

**Figura 2- 6:** Evaluación de la selectividad MR1

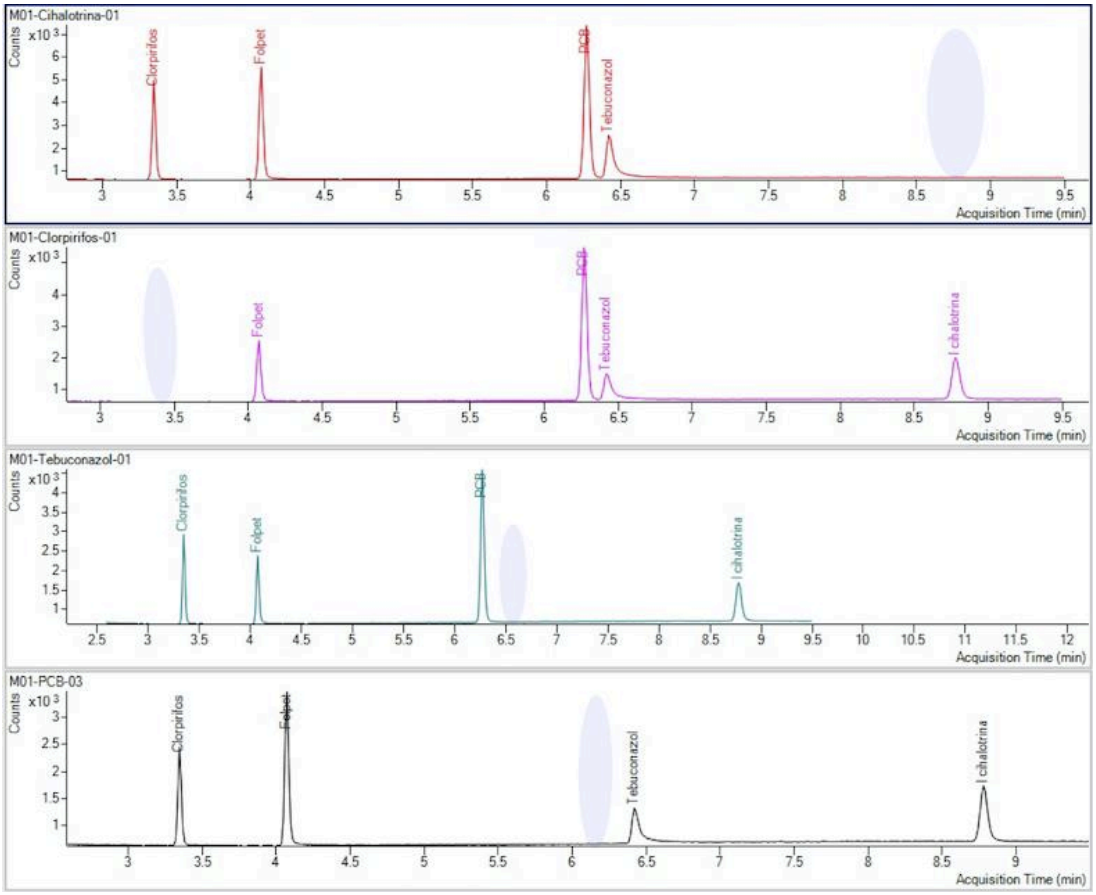
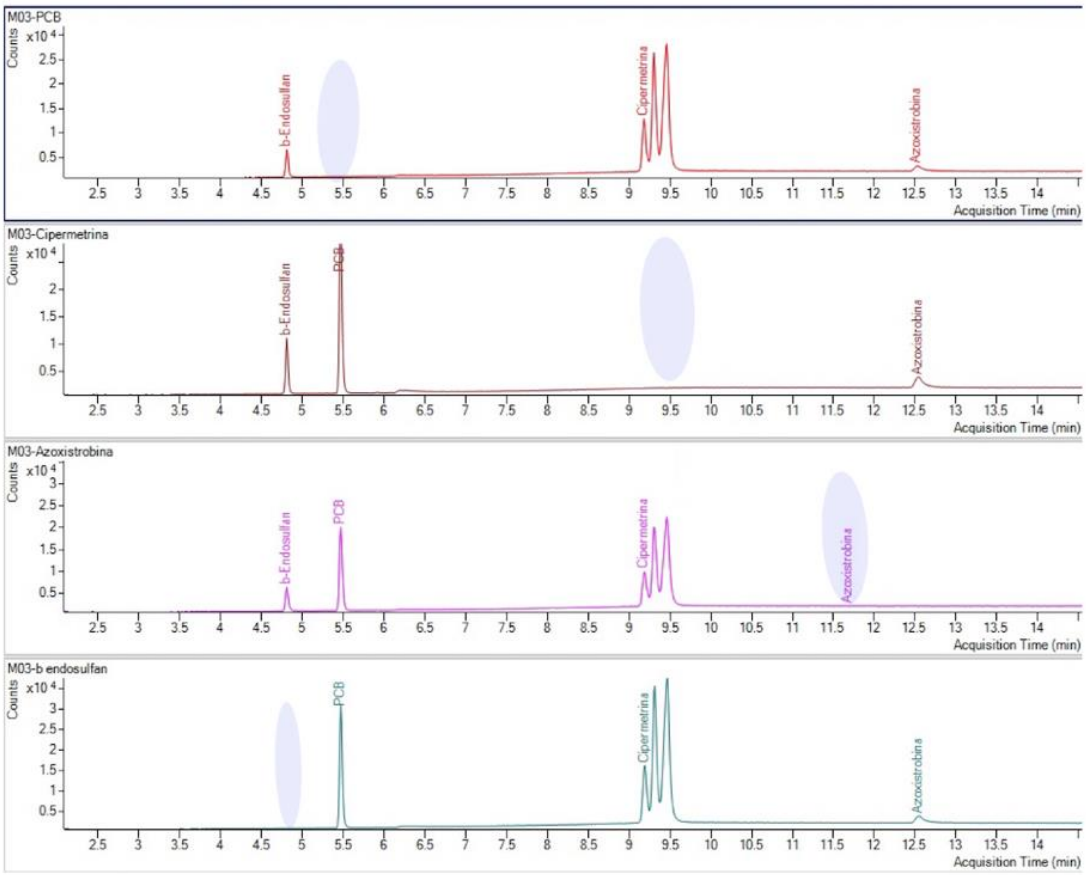


**Figura 2- 7**: Evaluación de la selectividad MR3




A partir de los resultados obtenidos de esta evaluación, se pudo evidenciar que los métodos se encontraban en la capacidad de determinar selectivamente los analitos de cada material candidato, incluso en presencia de los demás componentes ya que no presentaron señales en los mismos tiempos de retención, que pudieran interferir con su determinación.

- *Linealidad*

Se determinó el intervalo lineal para cada uno de los componentes de los materiales candidato. En todos los casos se presentaron coeficientes de determinación $R^2$ entre 0,9924 y 0,9994. Todos los modelos fueron validados a través del análisis de residuales y el análisis de varianza. A partir de los resultados, se evidenció que los residuales obtenidos fueron siempre inferiores a 3 % y a partir de los análisis de regresión, se demostró que

para todos los compuestos un modelo lineal y=mx+b, a un 95% de nivel de confianza ($\alpha$=0,05) se ajustaba a los datos.

Así mismo, se emplearon estadísticos t-student, para demostrar la significancia de la pendiente y el intercepto, encontrando que en todos los casos la pendiente es significativamente diferente de cero. Igualmente, el intercepto fue estadísticamente diferente de cero (p-valor<0,05) para todos los compuestos excepto para la bifentrina. Finalmente, se evaluó la falta de ajuste o desvío de la linealidad, la cual tuvo como objetivo determinar si se presentaba desvío de la respuesta cromatográfica a los extremos de las curvas. La **Tabla 2- 7** presenta los resultados de la evaluación estadística de la linealidad.

**Tabla 2- 7:** Evaluación estadística de la linealidad

| *Método* | *Compuesto* | *Coeficiente de determinación* | *p-valor pendiente* | *p-valor intercepto* | *p-valor ANOVA de regresión* | *p-valor falta de ajuste* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Folpet | 0,9994 | $1,56x10^{-79}$ | *3,42* $x10^{-09}$ | $1,56x10^{-79}$ | 0,07489 |
| | Tebuconazol | 0,9982 | $9,79x10^{-86}$ | *5,48* $x10^{-30}$ | $9,79x10^{-86}$ | 0,17300 |
| | $\lambda$-Cihalotrina | 0,9985 | $7,20x10^{-63}$ | *4,00* $x10^{-08}$ | $7,20x10^{-63}$ | 0,19040 |
| | Clorpirifos | 0,9986 | $2,59x10^{-70}$ | *2,80* $x10^{-26}$ | $2,59x10^{-70}$ | 0,06640 |
| 2 | Carbofurano | 0,9987 | $5,45x10^{-49}$ | *1,95* $x10^{-31}$ | $5,45x10^{-49}$ | 0,08228 |
| | Dimetomorf | 0,9924 | $9,17x10^{-54}$ | *2,06* $x10^{-13}$ | $9,17x10^{-54}$ | 0,16130 |
| | DDE | 0,9973 | $2,95x10^{-76}$ | *2,99* $x10^{-09}$ | $2,95x10^{-76}$ | 0,36907 |
| | Dimetoato | 0,9976 | $1,96x10^{-51}$ | *5,09* $x10^{-06}$ | $1,96x10^{-51}$ | 0,14790 |
| 3 | Azoxistrobina | 0,9980 | $2,38x10^{-73}$ | *1,46* $x10^{-88}$ | $2,38x10^{-73}$ | 0,55780 |
| | $\beta$-endosulfan | 0,9991 | $6,76x10^{-45}$ | *8,72* $x10^{-30}$ | $6,76x10^{-45}$ | 0,63030 |
| | Cipermetrina | 0,9933 | $7,09x10^{-54}$ | *3,31*$x10^{-38}$ | $7,09x10^{-54}$ | 0,05828 |
| 4 | Difenoconazol | 0,9969 | $5,18x10^{-43}$ | *3,70* $x10^{-23}$ | $5,18x10^{-43}$ | 0,08190 |
| | Clordano | 0,9963 | $6,32x10^{-48}$ | *6,91*$x10^{-18}$ | $6,32x10^{-48}$ | 0,06312 |
| | Bifentrina | 0,9985 | $8,22x10^{-56}$ | *3,02* $x10^{-01}$ | $8,22x10^{-56}$ | 0,61380 |

Los resultados de la prueba de falta de ajuste mostraron que, en una primera evaluación se presentó desvío de la linealidad (p-valor<0,05) para compuestos como $\lambda$-cihalotrina, cipermetrina, carbofurano y dimetomorf, especialmente a las concentraciones mas bajas. Por lo que se hizo necesario, disminuir los intervalos, partiendo de concentraciones iguales o superiores a 5 mg/kg. De este modo, se lograron obtener valores de probabilidad mayores a 0,05; asegurando que no existe este desvío. Finalmente, la siguiente tabla presenta los intervalos lineales para cada compuesto, los cuales se encontraron entre 1,14 mg/kg y 23,23 mg/kg , para azoxistrobina y folpet, respectivamente.

**Tabla 2- 8:** Intervalos lineales de cada compuesto

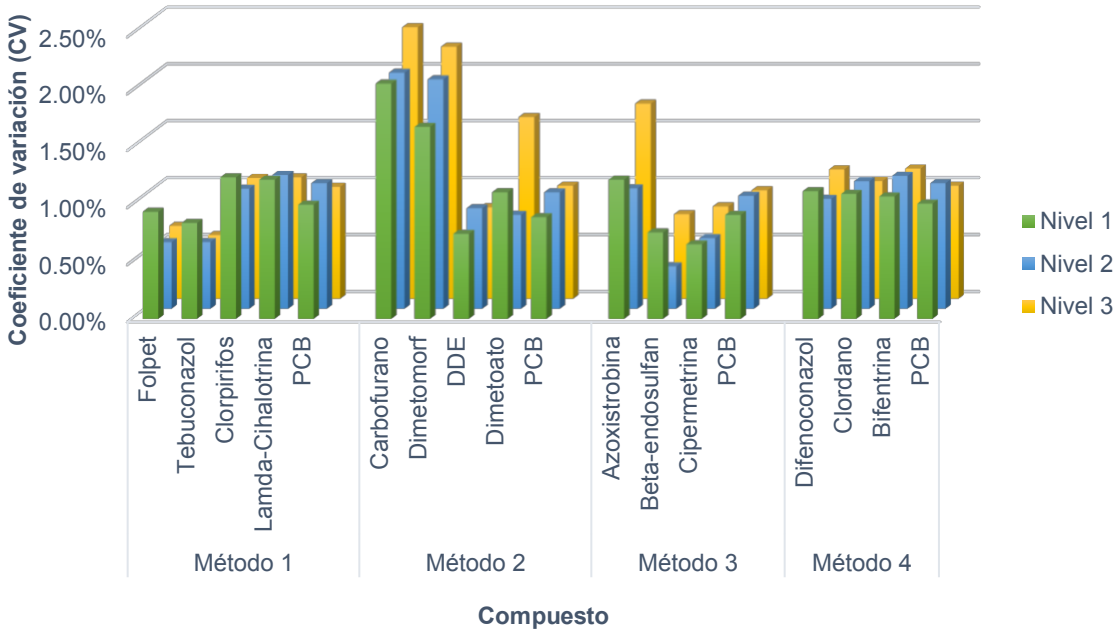
| *Método* | *Compuesto* | *Mínima concentración* (mg/kg)* | *Máxima concentración (mg/kg)* |
|---|---|---|---|
| 1 | Folpet | 5,047 | 23,233 |
| | Tebuconazol | 1,158 | 17,217 |
| | λ-Cihalotrina | 5,012 | 20,944 |
| | Clorpirifos | 2,908 | 21,167 |
| 2 | Carbofurano | 7,024 | 19,060 |
| | Dimetomorf | 7,183 | 29,766 |
| | DDE | 3,108 | 29,746 |
| | Dimetoato | 3,124 | 17,642 |
| 3 | Azoxisrobina | 1,146 | 20,797 |
| | β-endosulfan | 2,897 | 13,649 |
| | Cipermetrina | 4,762 | 20,024 |
| 4 | Difenoconazol | 2,886 | 14,901 |
| | Clordano | 2,932 | 18,834 |
| | Bifentrina | 5,042 | 19,049 |

*Concentración establecida como límite de cuantificación de cada analito

- *Precisión en condiciones de repetibilidad*

Considerando, que la evaluación de los estudios de estabilidad y homogeneidad de materiales de referencia empleando un diseño isócrono, se realiza en condiciones de repetibilidad, se procedió a evaluar la precisión de cada uno de los compuestos bajo estas condiciones. Para ello, se evaluaron tres niveles de concentración, los cuales fueron preparados a concentraciones entre 5 mg/kg y 15 mg/kg. Los resultados mostraron que el 78% de los analitos presentan coeficientes de variación inferiores a 1,24% en todos los niveles evaluados (n=7), mientras que el 22% de los compuestos presentaron coeficientes de variación entre 1,68% y 2,38%. La **Figura 2- 8** muestra los coeficientes de variación obtenidos en cada método.

**Figura 2- 8:** Precisión como repetibilidad obtenida en cada método a tres diferentes niveles de concentración




En la **Figura 2- 8**, se puede evidenciar que en general, los métodos tuvieron una buena precisión para todos los compuestos, a excepción de dimetomorf y carbofurano, para los cuales se encontraron coeficientes de variación de hasta 2,21% y 2,38%, respectivamente. Sin embargo, esta variación se consideró adecuada para el propósito dado que se espera una incertidumbre objetivo del 1% y con prácticamente 5 réplicas independientes se logra obtener una incertidumbre estándar relativa de cerca del 1,06%, en el componente que más significativo.

Por otro lado, se evaluó la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilk, encontrándose valores de probabilidad mayores a 0,05 para la mayoría de los conjuntos de datos, lo cual indicó que en general, éstos siguen una distribución normal, a excepción de los resultados obtenidos para el nivel más alto de carbofurano y dimetomorf, cuyos valores de probabilidad fueron inferiores a 0,05. Por lo anterior, fue necesario emplear una prueba de homocedasticidad robusta a la no normalidad de los datos, la cual fue empleada para todos los analitos. En este sentido, se empleó la prueba de Levene [82]. La **Tabla 2-**

**9**, resume los valores de probabilidad obtenidos para cada compuesto a partir de la evaluación estadística.

**Tabla 2- 9:** Valores de probabilidad obtenidos en la evaluación estadística de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene).

| *Método* | *Compuesto* | *p-valor Shapiro-Wilk* | | | *p-valor* |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Nivel 1* | *Nivel 2* | *Nivel 3* | *Levene* |
| Método 1 | Folpet | 0,3438 | 0,9854 | 0,5390 | 0,6180 |
| | Tebuconazol | 0,7741 | 0,2073 | 0,3334 | 0,0960 |
| | Clorpirifos | 0,2701 | 0,3944 | 0,4414 | 0,0513 |
| | Lamda-Cihalotrina | 0,6634 | 0,6868 | 0,1449 | 0,0775 |
| Método 2 | Carbofurano | 0,3299 | 0,1474 | 0,0255 | 0,0569 |
| | Dimetomorf | 0,4808 | 0,5785 | 0,0270 | 0,0734 |
| | DDE | 0,4059 | 0,2653 | 0,5104 | 0,2257 |
| | Dimetoato | 0,3160 | 0,1698 | 0,8662 | 0,0260 |
| Método 3 | Azoxistrobina | 0,6838 | 0,1395 | 0,1679 | 0,7607 |
| | Beta-endosulfan | 0,5286 | 0,3504 | 0,0712 | 0,3713 |
| | Cipermetrina | 0,1666 | 0,4785 | 0,7826 | 0,1452 |
| Método 4 | Difenoconazol | 0,2616 | 0,0683 | 0,9272 | 0,1581 |
| | Clordano | 0,0779 | 0,3955 | 0,6980 | 0,3501 |
| | Bifentrina | 0,9307 | 0,3396 | 0,9822 | 0,0820 |

Como se puede observar en la tabla anterior, la prueba de Levene indicó que para el 93% de los casos se acepta la hipótesis nula ($p>0,05$), por lo cual se pudo evidenciar que la precisión del método es independiente de la concentración de los analitos, a excepción del dimetoato ($p<0,05$). A partir de la **Figura 2- 8**, se puede inferir que la diferencia en la precisión entre las concentraciones, se puede asociar al nivel más alto de concentración, por lo cual es importante considerar realizar las mediciones de este analito a concentraciones inferiores a 15 mg/kg de modo que se tenga una mejor precisión.

Finalmente, se estimaron las incertidumbres estándar relativas para cada uno de los plaguicidas evaluados a los tres niveles de concentración, las cuales se muestran en la **Tabla 2- 10**.

**Tabla 2- 10**: Incertidumbre estándar relativa de los métodos de medición

| | *Compuesto* | *u(%)* *Nivel 1* | *Nivel 2* | *Nivel 3* | *u(%)máxima (n=7)* |
|---|---|---|---|---|---|
| Método 1 | Folpet | 0,35% | 0,22% | 0,24% | 0,35% |
| | Tebuconazol | 0,32% | 0,22% | 0,21% | 0,32% |
| | Clorpirifos | 0,47% | 0,40% | 0,40% | 0,47% |
| | Lamda-Cihalotrina | 0,46% | 0,44% | 0,40% | 0,46% |
| Método 2 | Carbofurano | 0,78% | 0,78% | 0,90% | 0,90% |
| | Dimetomorf | 0,64% | 0,76% | 0,84% | 0,84% |
| | DDE | 0,28% | 0,33% | 0,30% | 0,33% |
| | Dimetoato | 0,42% | 0,31% | 0,60% | 0,60% |
| Método 3 | Azoxistrobina | 0,46% | 0,40% | 0,65% | 0,65% |
| | Beta-endosulfan | 0,29% | 0,14% | 0,28% | 0,29% |
| | Cipermetrina | 0,25% | 0,23% | 0,31% | 0,31% |
| Método 4 | Difenoconazol | 0,42% | 0,36% | 0,43% | 0,43% |
| | Clordano | 0,41% | 0,42% | 0,39% | 0,42% |
| | Bifentrina | 0,41% | 0,44% | 0,43% | 0,44% |

Así, se pudo evidenciar que 10 de 14 compuestos presentaron incertidumbres máximas entre 0,29% y 0,47 %, correspondientes a β-endosulfán y clorpirifos, respectivamente. Los cuatro compuestos restantes presentaron incertidumbres entre 0,60% y 0,90%, correspondientes a dimetoato y carbofurano, respectivamente. Finalmente, se pudo demostrar que para todos los plaguicidas se cumplió con el requisito de incertidumbre establecido para los métodos, el cual se fijó como 1 % ($u_{obj}$:1%).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la validación de los métodos de medición, se pudo concluir que los métodos son selectivos, lineales y suficientemente precisos, demostrando que son adecuados para su uso en la evaluación de la estabilidad de los materiales de referencia candidatos.

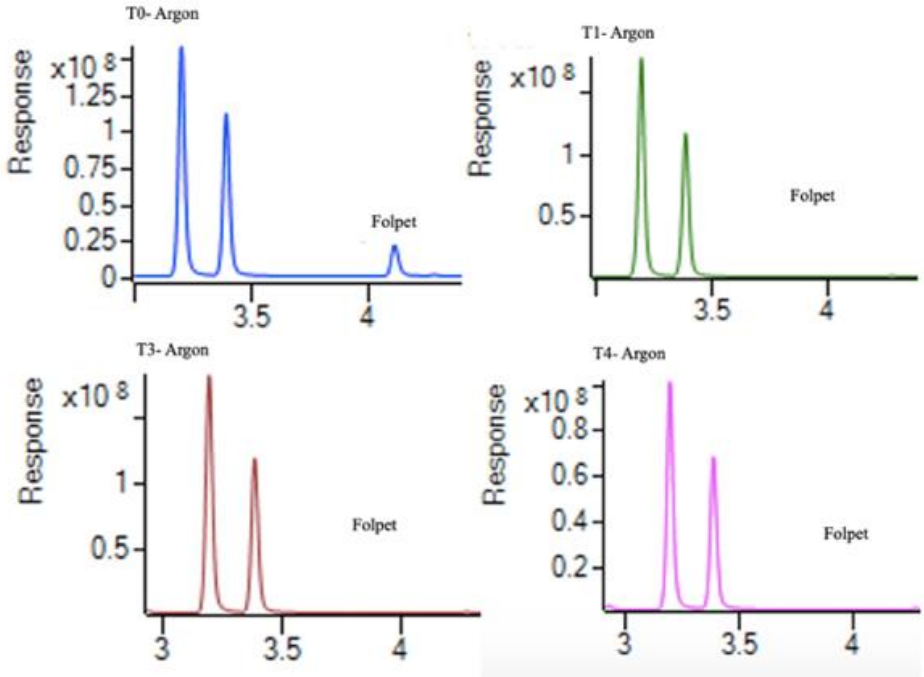
## 2.3.3 Evaluación de la estabilidad

Con el propósito de determinar el efecto de los diferentes tratamientos estudiados (ver 2.2.4), se realizaron estudios de estabilidad de los materiales candidatos. Estos estudios, se realizaron a través de diseños isócronos y las mediciones se realizaron empleando los métodos de medición desarrollados y validados.

- *Análisis preliminar*

En una análisis preliminar realizado sobre algunos de los cromatogramas obtenidos para los estudios de estabilidad, se pudo encontrar una rápida degradación del folpet en dos de los tratamientos, los cuales correspondieron a (i) ambiente oxidativo y (ii) atmósfera inerte. La **Figura 2- 9**, muestra un ejemplo de la degradación observada, en la cual se presenta la variación de la señal cromatográfica para folpet en los diferentes tiempos evaluados.

**Figura 2- 9**: Variación en la señal cromatográfica del folpet. Material saturado con atmosfera inerte

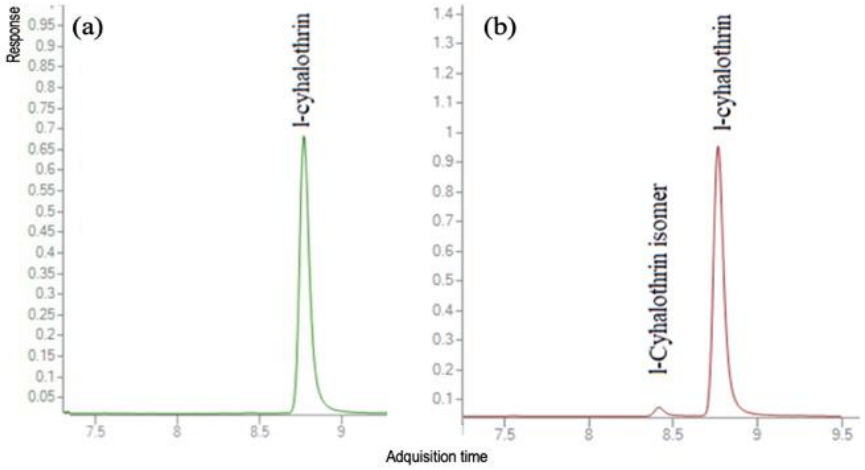



En la figura anterior se pudo observar que la señal debida al folpet, únicamente fue detectable en las ampollas almacenadas a temperatura de referencia (-80 ºC) desde el inicio de los estudios de estabilidad (t=0), exhibiendo que posiblemente la degradación de

este compuesto sigue un mecanismo diferente a la oxidación, pues este comportamiento es equivalente para los dos tratamientos: ambiente oxidativo y atmósfera inerte.

Por otro lado, en la **Figura 2- 10** se puede apreciar la capacidad del método 1, de separar y detectar un producto de degradación, correspondiente presuntamente a un isómero de la λ-Cihalotrina, el cual fue identificado por espectrometría de masas y es coherente con los reportes de literatura [66].

**Figura 2- 10**: Detección de isómero de λ–cihalotrina (a) t=0 y (b) t=14 días




Acorde con otras investigaciones este fenómeno ocurre durante los procesos de inyección en lugar de procesos de degradación en la en solución [66]. Sin embargo, en este estudio se encontró que la inestabilidad de la λ-cihalotrina ocurre en solución y no en el sistema cromatográfico; esta conclusión es soportada por el hecho de que la señal del isómero nunca fue detectada en los materiales del tiempo 0, almacenados a -80 ºC ni en los controles de calidad, los cuales fueron preparados y medidos en el mismo día. Es importante, señalar que todas las mediciones se realizaron de manera aleatoria en condiciones de repetibilidad, acorde a lo indicado en la sección 2.2.6.

- *Análisis de tendencia de medición*

Previo a realizar la evaluación de la estabilidad de los materiales de referencia candidatos, se realizó un análisis de tendencia a partir de las mediciones de los controles de calidad a lo largo de la secuencia de medición (n=7), correspondientes a soluciones de los mismos componentes de los MR, las cuales fueron preparadas previo a la medición a concentraciones aproximadamente iguales a las de los analitos en cada material.

Con el fin de presentar una evidencia objetiva, los datos se evaluaron a través de un análisis de regresión para determinar la existencia de un modelo lineal (y=mx+b) a un 95% de nivel de confianza ($\alpha$=0,05). La **Tabla 2- 11**, resume los valores de probabilidad obtenidos de este análisis para cada material y tratamiento.

**Tabla 2- 11:** Valores de probabilidad obtenidos en el análisis de tendencia de medición

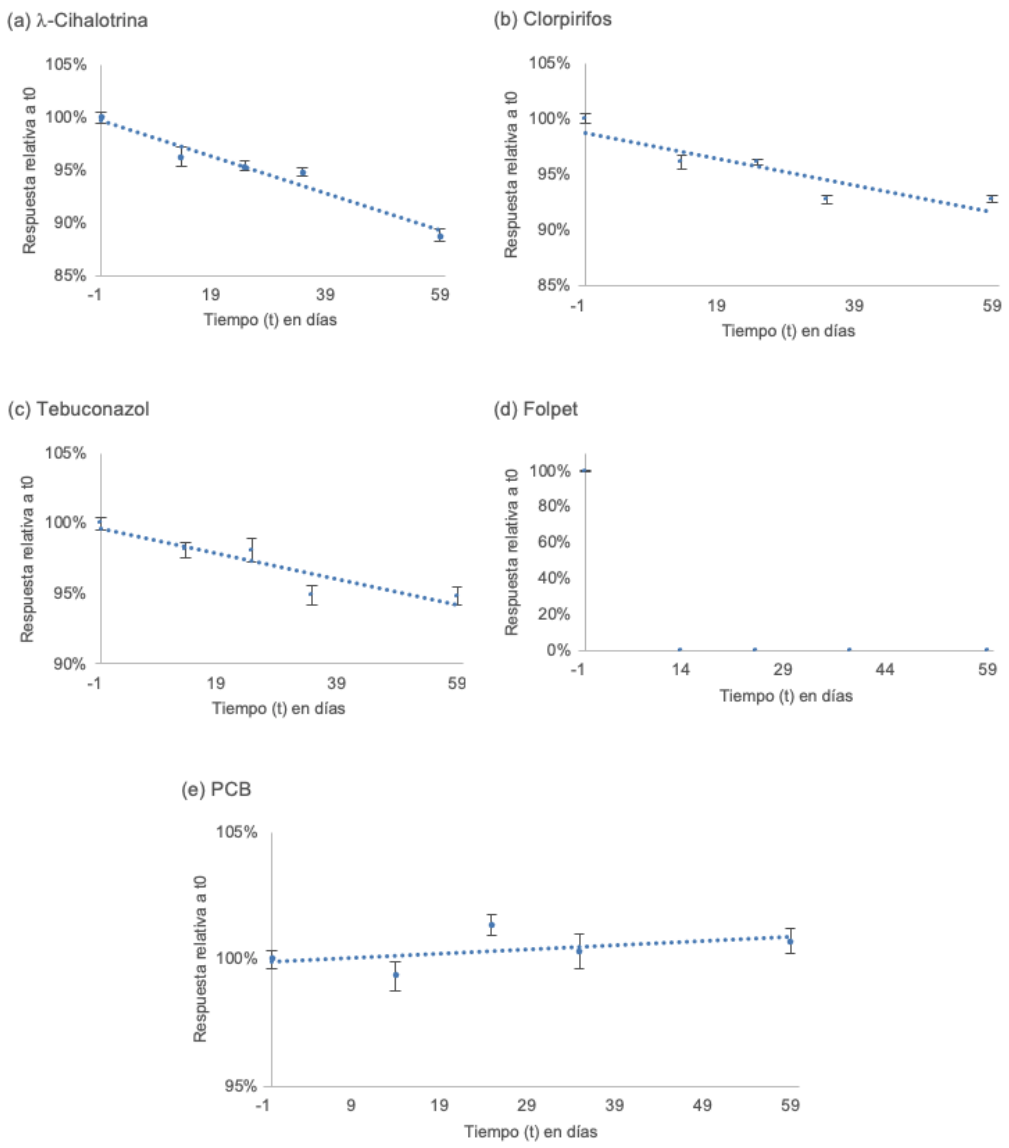
| | | *Valores de probabilidad (p-valor)* | | |
|---|---|---|---|---|
| *Material candidato* | *Compuesto* | *Ambiente oxidativo* | *Atmósfera inerte* | *Atmósfera inerte y ácido fórmico* |
| 1 | Folpet | 0,5361 | 0,6562 | 0,4504 |
| | Tebuconazol | 0,7740 | 0,8634 | 0,7604 |
| | $\lambda$-Cihalotrina | 0,4092 | 0,5978 | 0,3276 |
| | Clorpirifos | 0,5833 | 0,2446 | 0,7094 |
| | PCB | 0,6895 | 0,9645 | 0,5436 |
| 2 | Carbofurano | 0,4034 | 0,5653 | 0,1807 |
| | Dimetomorf | 0,9174 | 0,7389 | 0,6895 |
| | DDE | 0,5783 | 0,1927 | 0,8381 |
| | Dimetoato | 0,4026 | 0,7389 | 0,6251 |
| | PCB | 0,8232 | 0,6923 | 0,6625 |
| 3 | Azoxistrobina | 0,5547 | 0,162 | 0,3966 |
| | $\beta$-endosulfan | 0,6258 | 0,4869 | 0,7368 |
| | Cipermetrina | 0,9863 | 0,2850 | 0,5494 |
| | PCB | 0,4265 | 0,0801 | 0,9782 |
| 4 | Difenoconazol | 0,2712 | 0,4887 | 0,7673 |
| | Clordano | 0,9888 | 0,6793 | 0,2280 |
| | Bifentrina | 0,5539 | 0,2605 | 0,8381 |
| | PCB | 0,3771 | 0,6010 | 0,1722 |

Como se puede observar en la tabla anterior, luego del análisis estadístico se obtuvieron valores de probabilidad mayores a 0,05 para todos los compuestos y tratamientos aplicados, permitiendo concluir que no existió un error sistemático asociado a deriva instrumental durante las mediciones que pudiera afectar la evaluación de la estabilidad de los materiales de referencia candidatos.

- *Tratamiento 1: ambiente oxidativo*

En concordancia con la guía ISO 35 [8], la evaluación de los resultados del estudio de estabilidad de los MR sometidos a los diferentes tratamientos se realizó inicialmente de manera gráfica, con el fin de poder observar tendencias que indicaran la degradación de los compuestos sometidos a un ambiente oxidativo durante el tiempo evaluado. La **Figura 2-11** presenta la variación de la concentración (relativa al tiempo inicial o tiempo cero) de los diferentes plaguicidas para el MR 1.

**Figura 2-11**: Evaluación gráfica de la estabilidad del MR1 sometido a un ambiente oxidativo




En la **Figura 2-11** se puede observar que en general, los componentes del MR 1, a excepción del compuesto control (PCB), presentaron disminución de la concentración de

hasta 11,22% bajo las condiciones evaluadas. A través de los resultados obtenidos para el PCB, se puede evidenciar que tanto los procesos de preparación y envasado del material, como el almacenamiento y la medición fueron adecuados.

Por otro lado, para el caso del folpet, como se mostró en el análisis preliminar, su señal cromatográfica no pudo ser detectada a partir de los 14 días sugiriendo una rápida degradación en los primeros días del estudio. Para tebuconazol y λ-cihalotrina, se encontró una disminución de su concentración entre el 5,17% y 11,22%, para los 60 días del estudio.

En la **Figura 2-12** se puede observar que carbofurano, DDE y dimetoato, presentaron disminución de la concentración respecto a la obtenida en el tiempo 0 de hasta 19,5%. Para el caso de dimetoato, se observa una rápida degradación en los primeros 14 días, alcanzando una reducción en la concentración de aproximadamente el 10%. Por su parte, para dimetomorf y PCB no se observó disminución de su concentración en las condiciones de este estudio.

La **Figura 2-13** y

**Figura 2- 14** , muestran los resultados de la evaluación de los MR 3 y 4. La evaluación del MR 3, mostró que únicamente el compuesto cipermetrina presentó una variación evidente en su respuesta, respecto al tiempo 0, alcanzando una disminución de hasta un

12,22%. Los demás compuestos, incluyendo el PCB, presentaron respuestas muy cercanas al 100% durante los 60 días, sugiriendo la estabilidad de los compuestos a las condiciones evaluadas. Por su parte, como se puede observar en la

**Figura 2- 14**, para ninguno de los compuestos se presentó variación alguna de la concentración, en las condiciones evaluadas.

**Figura 2-12:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 2 sometido a un ambiente oxidativo

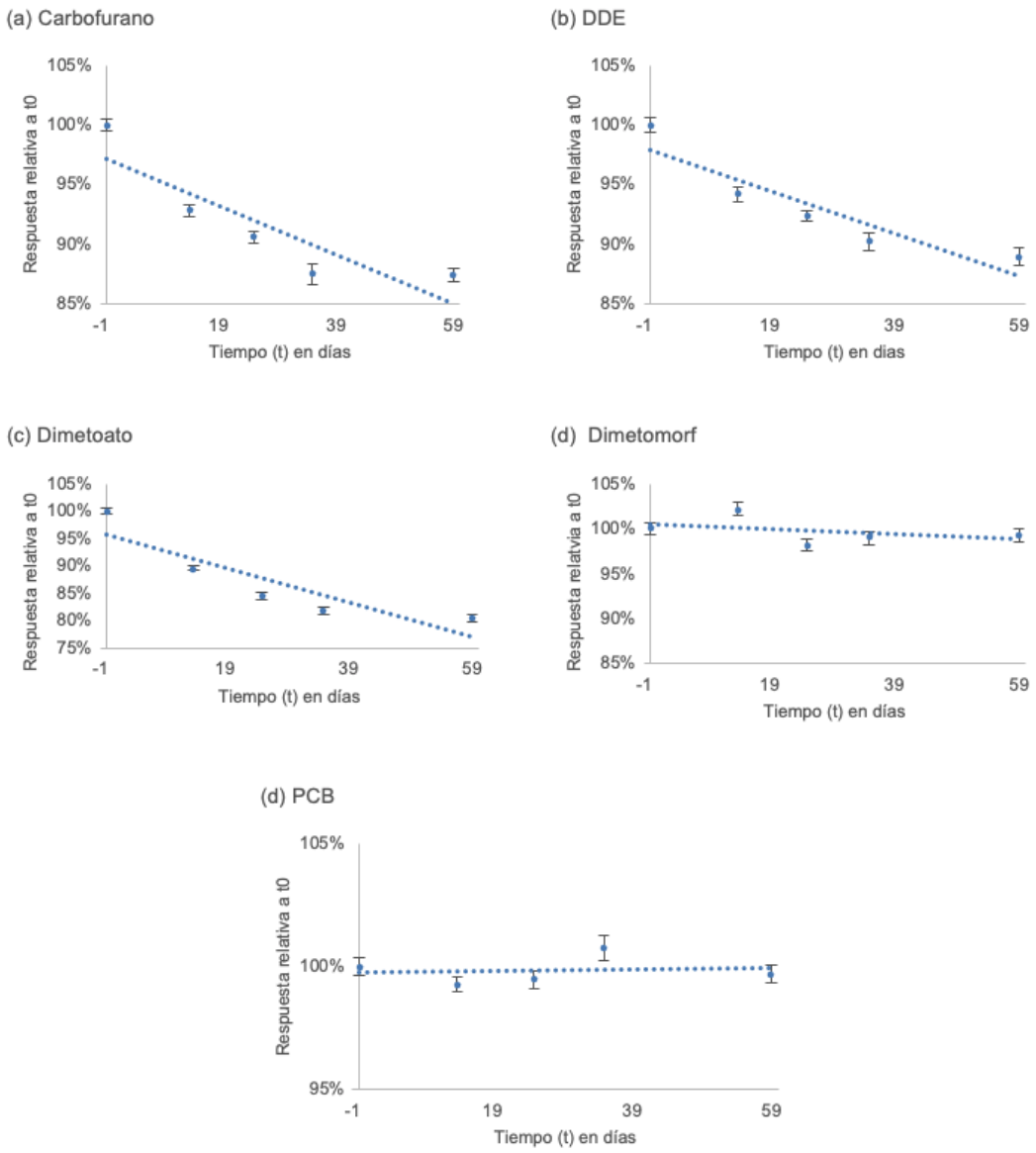


**Figura 2-13:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 3 sometido a un ambiente oxidativo

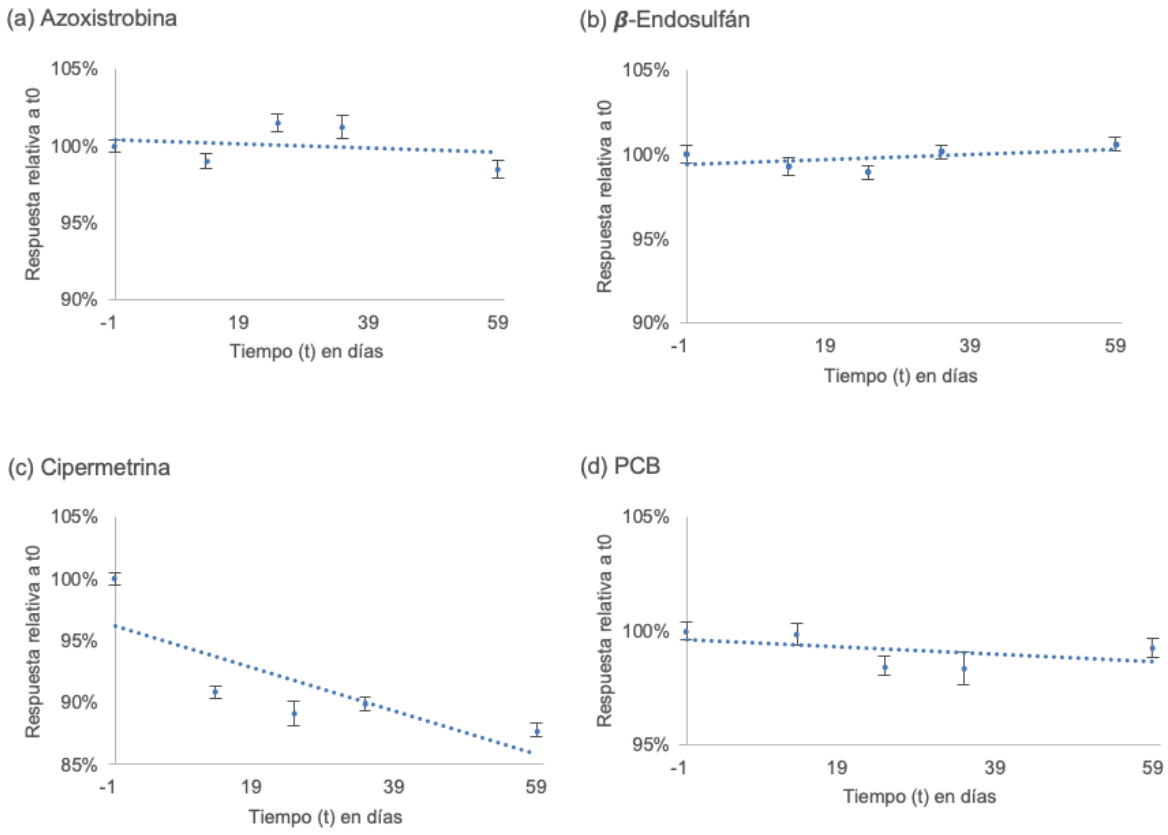
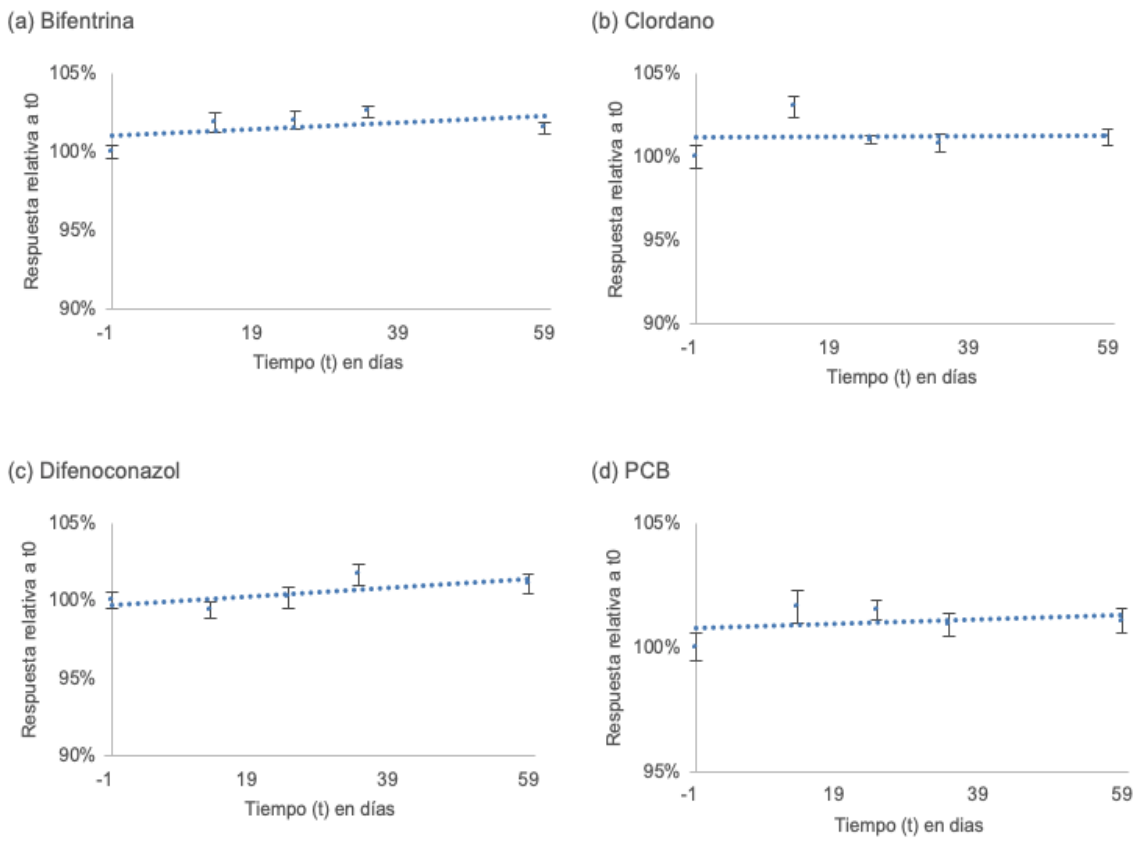


**Figura 2- 14:** Evaluación gráfica de la estabilidad del MR 4 sometido a un ambiente oxidativo




Por otro lado, y con el propósito de evidenciar de manera objetiva degradación de los compuestos en estudio, se evaluó el ajuste a diferentes modelos de cinética de reacción (Orden 0,1,2 y 3). En la **Tabla 2- 12** se presentan los coeficientes de determinación obtenidos en esta evaluación para cada componente de los materiales de referencia candidatos sometidos a un ambiente oxidativo.

**Tabla 2- 12:** Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales expuestos a un ambiente oxidativo

| | *Compuesto* | *Coeficiente de determinación $R^2$* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Orden 0 | Orden 1 | Orden 2 | Orden 3 |
| MR 1 | Clorpirifos | 0,8029 | 0,8058 | 0,8084 | 0,8108 |
| | λ–Cihalotrina | 0,9555 | 0,9533 | 0,9502 | 0,9464 |
| | Tebuconazol | 0,8271 | 0,8265 | 0,8258 | 0,8251 |

**Tabla 2- 12:** (Continuación)

| | *Compuesto* | *Coeficiente de determinación $R^2$* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Orden 0 | Orden 1 | Orden 2 | Orden 3 |
| MR2 | Carbofurano | 0,7791 | 0,7891 | 0,7986 | 0,8076 |
| | DDE | 0,8463 | 0,8573 | 0,8679 | 0,8782 |
| | Dimetoato | 0,7927 | 0,8112 | 0,8289 | 0,8458 |
| | Dimetomorf | 0,1706 | 0,1704 | 0,1701 | 0,1699 |
| MR3 | Azoxistrobina | 0,0602 | 0,0642 | 0,0642 | 0,0645 |
| | β-Endosulfan | 0,2694 | 0,2677 | 0,2660 | 0,2642 |
| | Cipermetrina | 0,6431 | 0,6537 | 0,6644 | 0,6753 |
| MR4 | Bifentrina | 0,2608 | 0,2622 | 0,2637 | 0,2651 |
| | Clordano | 0,0032 | 0,0037 | 0,0042 | 0,0047 |
| | Difenoconazol | 0,4883 | 0,4889 | 0,4894 | 0,4900 |

A partir de estos resultados se encuentra que, siete compuestos correspondientes a los materiales de referencia 1, 2 y 3, presentaron coeficientes de determinación $R^2$ relativamente altos ($R^2$ >0,6431) indicando una degradación de los compuestos en un ambiente oxidativo. Para estos casos, el modelo de regresión fue significativo ( $p<0,05$). Por su parte, para el caso del folpet no se pudo evaluar la significancia de un modelo de regresión por lo que se no se presenta en la tabla.

En general, los compuestos que mostraron disminución de su concentración en función del tiempo siguieron una cinética de reacción de orden 0 a excepción del dimetoato y la cipermetrina, compuestos para los cuales un modelo de cinética de primer y segundo orden, respectivamente presentaron un mejor ajuste. La **Figura 2- 15** y **Figura 2- 16** muestran las cinéticas de degradación de estos compuestos.

**Figura 2- 15:** Cinética de primer orden de dimetoato.

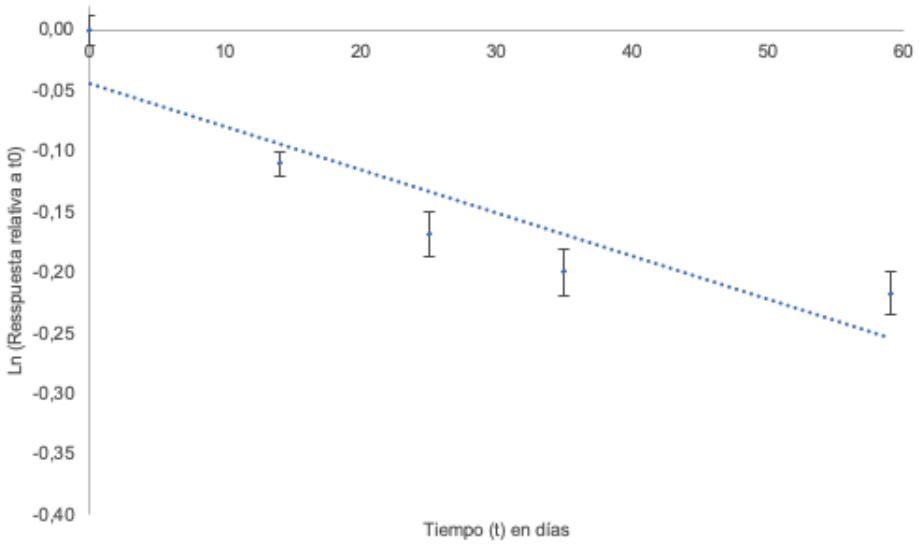
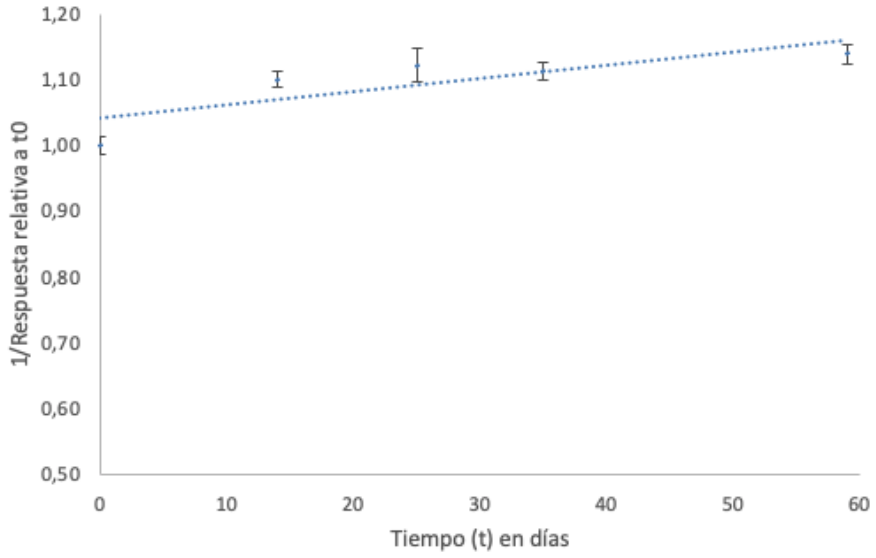


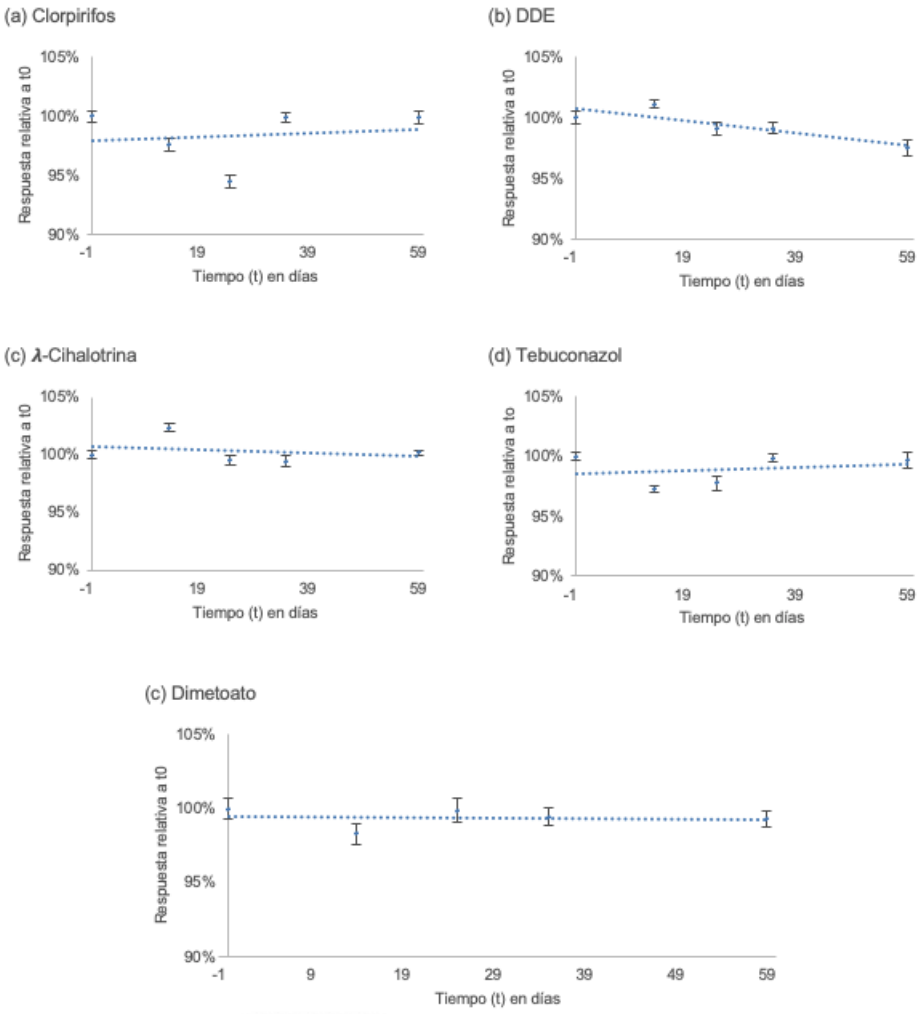

**Figura 2- 16**: Cinética de segundo orden de cipermetrina



- *Tratamiento 2: atmósfera inerte*

Por otro lado, con el fin de evitar procesos de oxidación o procesos de hidrólisis que puedan ocurrir, se aplicaron los tratamientos descritos en el numeral 2.2.4. La inclusión atmósfera inerte, tuvo como objetivo desplazar el oxígeno presente en el espacio de cabeza de los materiales, en este sentido se reduce la posibilidad de procesos de oxidación. En términos prácticos, un productor de materiales de referencia (PMR) al aplicar esta opción, puede aumentar la vida media de los materiales a través de una alternativa relativamente sencilla, rápida y económica. La **Figura 2- 17**, muestra los plaguicidas para los cuales se obtuvieron resultados positivos a través de la aplicación de este tratamiento

**Figura 2- 17**: Mejora de la estabilidad asociada a la presencia de una atmósfera inerte en las ampollas.



Al comparar los resultados presentados en la figura anterior, con los obtenidos en el tratamiento 1 se puede evidenciar que compuestos como clorpirifos, tebuconazol, dimetoato, DDE y λ-cihalotrina, presentaron una mejora en su estabilidad permitiendo mantener su concentración alrededor de 100% durante el periodo evaluado, sugiriendo que su degradación es debido principalmente a reacciones de oxidación; lo anterior considerando que al aplicar el tratamiento de saturación con atmósfera inerte a partir del cual se desplazó el oxígeno del aire, se logró contrarrestar la oxidación de estos componentes en los materiales.

De acuerdo a los reportes de literatura, clorpirifos y dimetoato pueden sufrir dos tipos de descomposición, la primera se encuentra asociada a la hidrólisis del grupo fosfato y la segunda se encuentra asociada a la oxidación del compuesto. En este sentido, de acuerdo a los resultados encontrados en la **Figura 2-11** y en la **Figura 2-12**, se puede afirmar que el principal mecanismo de degradación en materiales de referencia se asocia a la oxidación del grupo azufrado [83], [84].

Respecto a la oxidación de estos componentes se ha encontrado que compuestos organofosforados, los cuales presentan el grupo fosforotionato en su estructura son susceptibles a sufrir procesos de oxidación que favorecen la sustitución del azufre del enlace (P=S) bajo ciertas condiciones dando lugar al respectivo oxon (P=O) [85]–[87], la formación del oxón del dimetoato (ometoato) es tan usual, que de hecho es definido como residuo del plaguicida en alimentos y su contenido es regulado por la Unión Europea y el CODEX alimentarius [88].

Para el caso de la λ-cihalotrina, se conoce que este tipo de piretroides los cuales presentan en su estructura un sustituyente ciano (α-C≡N), son altamente inestables debido a que pueden sufrir reacciones de fotólisis e hidrólisis, especialmente a pH superiores a 9, e incluso pueden ser susceptibles a sufrir procesos de oxidación, que pueden ocurrir por la ruptura del enlace carboxilo o del enlace éster de la molécula y posterior hidroxilación, reportándose hasta 12 productos de degradación [89],[90]. De acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento 1 y 2, se encuentra que el principal de mecanismo de descomposición se asocia a procesos de oxidación, pues se logró una excelente mejora de su estabilidad a través de la inclusión de una atmósfera inerte.

Para el caso del DDE con la atmósfera inerte se mejoró su estabilidad hasta cuatro veces, presentando una disminución de 3% una vez concluido el estudio. De acuerdo a reportes de literatura, este compuesto en sistemas aeróbicos se descompone a DDA. Por lo anterior, al eliminar el oxígeno del medio, el compuesto incrementa su estabilidad [91], [92].

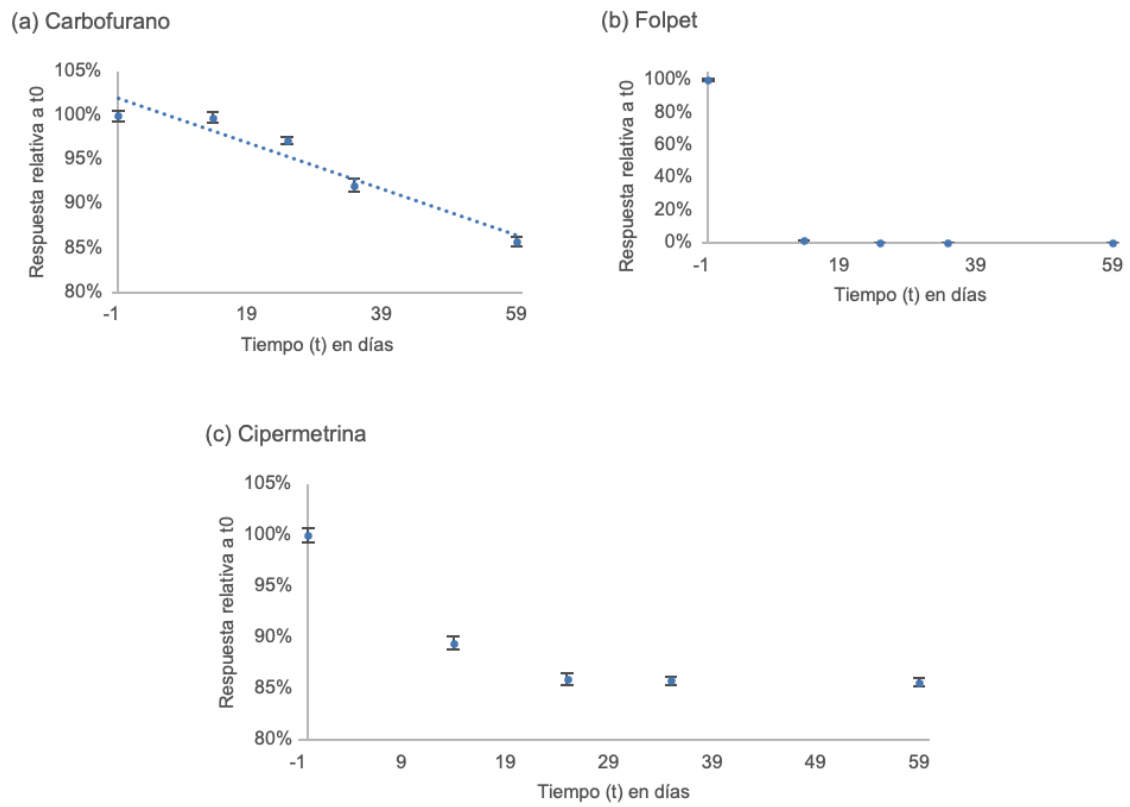
Por otro lado, y al igual que para el caso del dimetoato, existen otros diferentes mecanismos de descomposición para el DDE, los cuales incluyen oxidación, dehidrocloración y reducción. Sin embargo, para que ocurran los dos últimos procesos se requieren de condiciones reductoras y concentraciones altas de protones en el medio, lo cual es poco probable en las condiciones en las que se encuentra el material [93]. Finalmente, para que exista una reducción de este compuesto y ocurra la conversión a DDD, se requiere de una temperatura mucho mayor, así como impurezas que catalicen esta reacción [80]. Sin embargo, no se descarta por completo que existan otras reacciones diferentes a la oxidación del DDE, pues al observar la **Figura 2- 17** se encuentra un leve descenso en la concentración del DDE.

Igualmente, se ha encontrado que es posible la formación de productos de degradación de compuestos organoclorados como el DDE, especialmente generados a partir de la presencia de oxígeno y su reacción con algunos intermediarios presentes en el medio o formados bajo ciertas condiciones que, usualmente incluyen reacciones de fotooxidación [92], [94]–[96]. Es de tener en cuenta que a partir de los resultados obtenidos de la aplicación de los tratamientos de estabilización, se buscaba entender el posible mecanismo de degradación que siguieron los componentes de los materiales, sin embargo, y teniendo en cuenta que el principal objetivo de esta investigación esta dirigido a incrementar la estabilidad de los componentes y no a la identificación o cuantificación de los productos de degradación, estos no fueron monitoreados.

Finalmente, para el caso de tebuconazol, el principal mecanismo de degradación que se reporta es la oxidación, la cual puede ocurrir debido a la oxidación consecutiva de uno de los metilos del grupo terbutil, generando el respectivo alcohol y posterior ácido carboxílico [97], [98]. Por lo anterior los resultados presentados en la **Figura 2- 17** son totalmente coherentes, pues en ausencia de oxígeno es prácticamente imposible que se lleve a cabo esta reacción.

Por otro lado, en la **Figura 2- 18** se presentan los plaguicidas que no obtuvieron ningún tipo de mejora al aplicar este tratamiento de estabilización. De manera general, los resultados sugieren que estos plaguicidas no se afectan por procesos oxidativos y que su inestabilidad se asocia a otros posibles mecanismos de reacción.

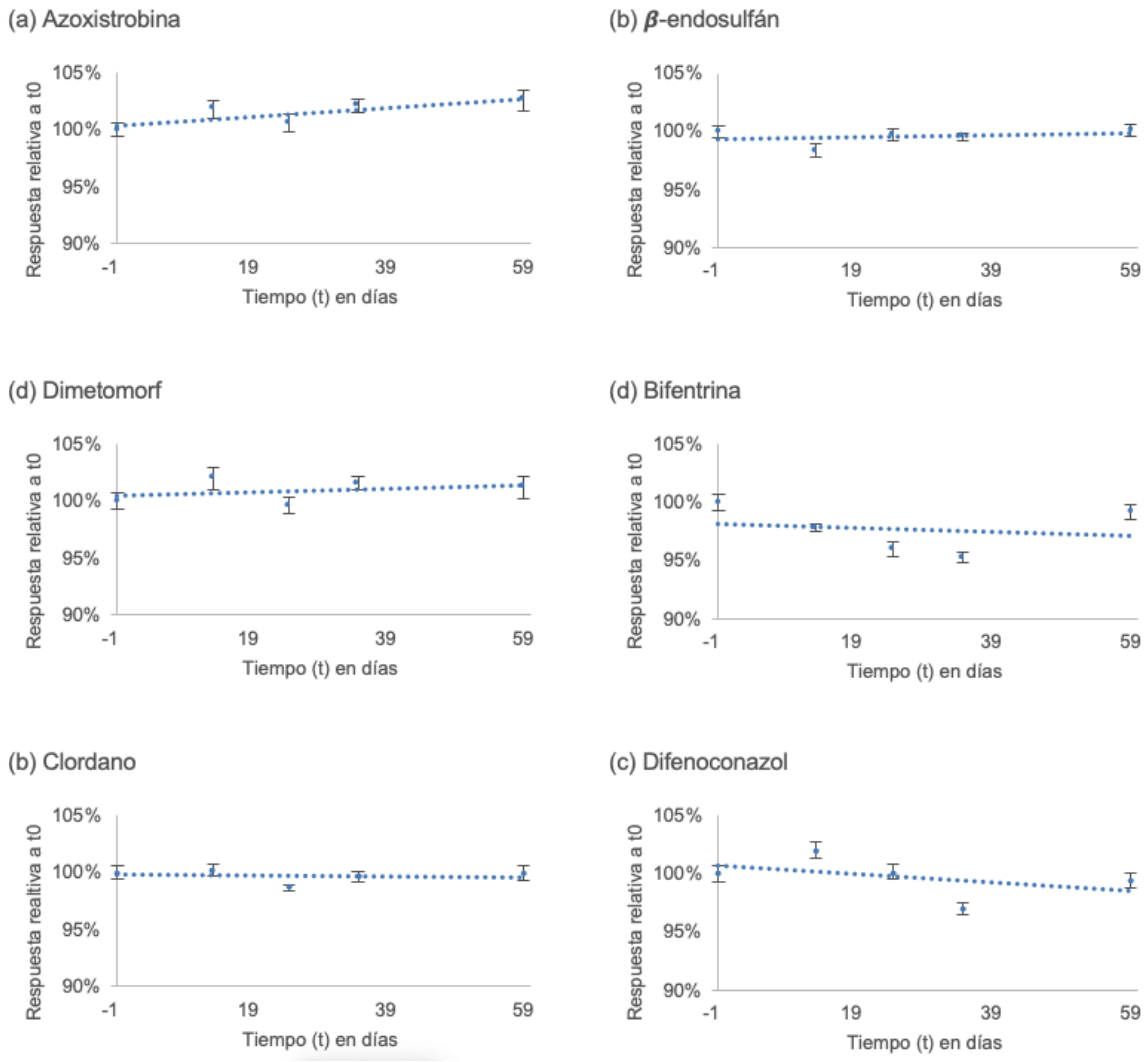
**Figura 2- 18:** Plaguicidas que no presentaron cambios en su inestabilidad al aplicar una atmósfera inerte




Como se puede apreciar en la **Figura 2- 18**, en el caso del folpet, la saturación con argón no representó ninguna mejora en su estabilidad, permitiendo inferir, que la degradación de este compuesto no se asocia a reacciones de oxidación; al igual que en el primer tratamiento este compuesto sólo pudo ser determinado en las unidades almacenadas a temperatura de referencia (-80 ºC). De igual manera, **Figura 2- 18**, muestra que para el caso del carbofurano no se encontró ninguna mejora al emplear una atmósfera de argón, pues se replicó el mismo comportamiento del ambiente oxidativo, presentando una disminución de su concentración de cerca del 15%.

Por su parte, para cipermetrina se presentó disminución de su concentración de manera similar que cuando fue sometida a un ambiente oxidativo, disminuyendo su concentración hasta en un 10% en los primeros 14 días del estudio y manteniéndose alrededor de 85% a partir de los 25 días hasta finalizar el estudio.

**Figura 2- 19:** Plaguicidas que no presentaron cambios en su estabilidad al aplicar una atmósfera inerte.




La **Figura 2- 19** presenta las curvas de estabilidad obtenidas al aplicar atmósfera inerte para los plaguicidas que presentaron un comportamiento estable incluso, al aplicar el tratamiento 1. En esta figura, se puede observar que este tratamiento no representó ningún cambio respecto a los resultados obtenidos previamente. Es importante mencionar,

que para todos los casos no se observó ninguna degradación en el PCB, el cual se empleo como control.

Por otra parte, y con el propósito de confirmar los resultados observados en la evaluación gráfica, se estimó la significancia de las regresiones obtenidas. A continuación se presentan los coeficientes de determinación $R^2$ para cada orden de reacción evaluado.

**Tabla 2- 13**: Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales tratados con atmosfera inerte

| | *Compuesto* | *Coeficientes de determinación $R^2$* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Orden 0* | *Orden 1* | *Orden 2* | *Orden 3* |
| MR1 | Clorpirifos | 0,0253 | 0,0248 | 0,0244 | 0,0258 |
| | λ–Cihalotrina | 0,0665 | 0,0662 | 0,0659 | 0,0668 |
| | Tebuconazol | 0,0564 | 0,0569 | 0,0575 | 0,0558 |
| MR2 | Carbofurano | 0,9300 | 0,9272 | 0,9237 | 0,9322 |
| | DDE | 0,7233 | 0,7268 | 0,7303 | 0,7197 |
| | Dimetoato | 0,0079 | 0,0075 | 0,0071 | 0,0084 |
| | Dimetomorf | 0,0945 | 0,0952 | 0,0960 | 0,0937 |
| MR3 | Azoxistrobina | 0,0644 | 0,0642 | 0,0642 | 0,0645 |
| | β-Endosulfan | 0,0988 | 0,0988 | 0,0988 | 0,0988 |
| | Cipermetrina | 0,6139 | 0,6226 | 0,6312 | 0,6053 |
| MR4 | Bifentrina | 0,0346 | 0,0343 | 0,0340 | 0,0350 |
| | Clordano | 0,0114 | 0,0112 | 0,0110 | 0,0116 |
| | Difenoconazol | 0,1944 | 0,1932 | 0,1918 | 0,1956 |

A partir de la tabla anterior se puede confirmar que compuestos como λ-cihalotrina, tebuconazol, clorpirifos, y dimetoato presentaron una mejora en su estabilidad al ser saturados con atmósfera inerte, manteniendo su concentración durante los 59 días evaluados. Para el caso del DDE, si bien se mejoró su estabilidad, se alcanza a percibir una leve tendencia que sugiere que la estabilidad de este compuesto puede verse influenciada por otros mecanismos de degradación. Igualmente, se evidenció que los compuestos folpet, carbofurano y cipermetrina, no fueron afectados por el tratamiento ya que su concentración disminuyó de manera similar que cuando fueron sometidos al

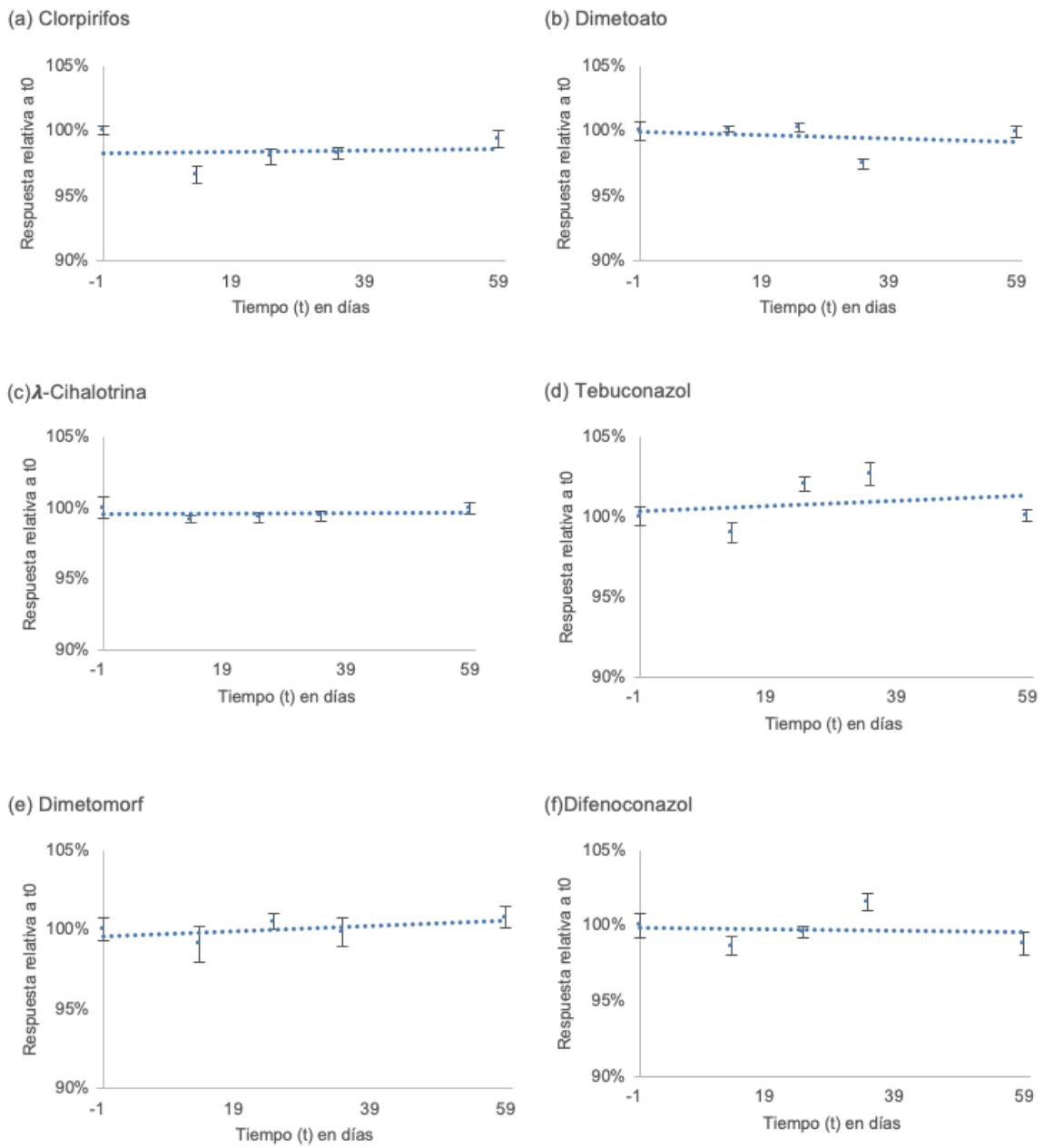
ambiente oxidativo. Para el caso del carbofurano, esta disminución se ajustó a una cinética de orden 0 (p-valor<0,05); mientras que para el caso de la cipermetrina, al igual que en el primer tratamiento se observó una disminución evidente de la concentración en el tiempo la cual se ajustó a un modelo de cinética de orden 2. De acuerdo a la forma que tiene la curva de degradación es posible que la cinética corresponda a una de orden 1, sin embargo debido a los pocos puntos que se tienen en el tiempo (en especial entre el tiempo 0 y el 14), se asume que la evaluación del modelo cinético a través de la significancia del modelo de regresión no sea suficiente.

Al comparar la **Tabla 2- 12** y **Tabla 2- 13**, se evidencian los beneficios del empleo de una atmósfera de argón, pues se observa un descenso en los coeficientes de determinación de los diferentes modelos cinéticos, lo cual implica un aumento de la estabilidad de manera general. En el tratamiento 3 se realizará una comparación más objetiva de esta mejora de la estabilidad.

- *Tratamiento 3: atmósfera inerte y ácido fórmico al 0,1%*

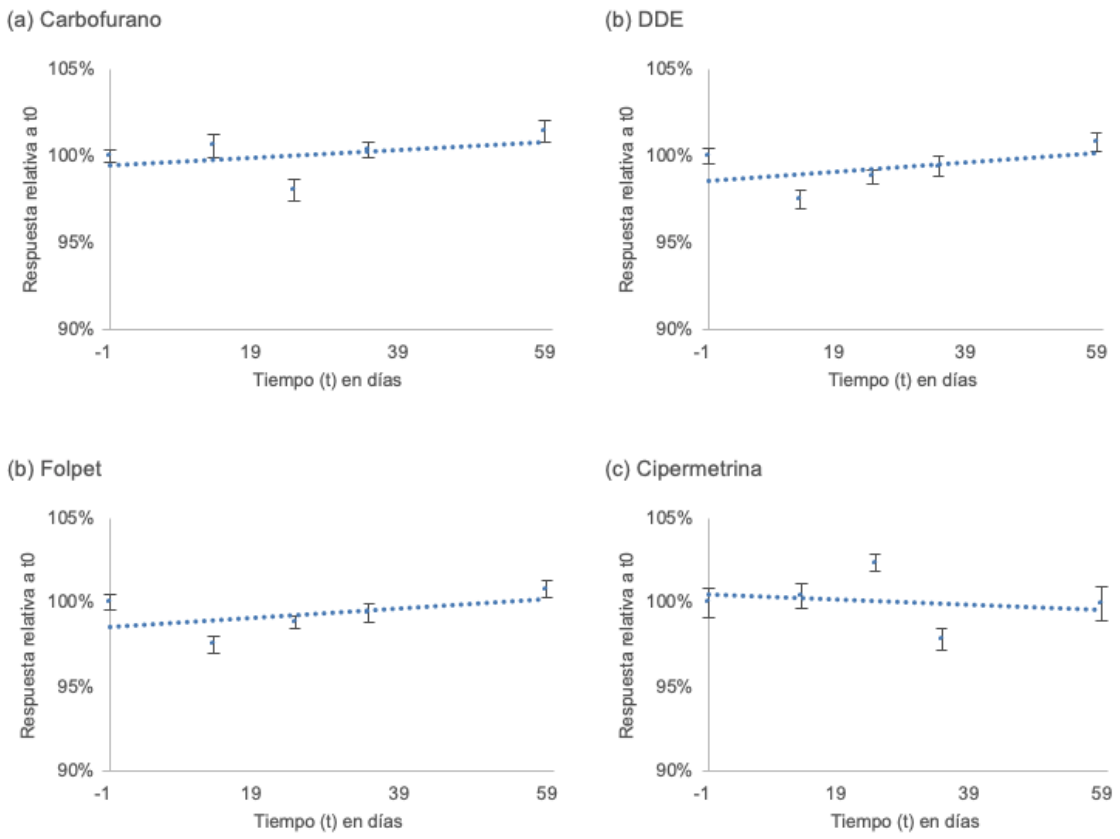
Finalmente, se evaluó el comportamiento de los analitos al ser expuestos a una temperatura de 50 ºC durante 59 días siendo estabilizados con el tercer tratamiento, el cual correspondió a la adición de ácido fórmico al 0,1% (p/p) y posterior saturación con atmósfera inerte de argón. En la **Figura 2- 20** se presentan los resultados para algunos plaguicidas seleccionados, los cuales se habían mostrado estables (tratamiento 1) o cuya estabilidad fue incrementada (tratamiento 2), esto con el fin de evidenciar que la adición de ácido fórmico no afectó su estabilidad. Igualmente, es importante resaltar que para bifentrina, β-endosulfan, azoxistrobina y, clordano se replicaron los resultados obtenidos en los tratamientos previos, es decir, la adición de ácido fórmico no afecto la estabilidad de estos compuestos.

**Figura 2- 20:** Evaluación gráfica para plaguicidas seleccionados, adicionado con ácido fórmico y atmósfera inerte.




Por otro lado, la **Figura 2- 21** presenta los plaguicidas que tuvieron un incremento en su estabilidad con el empleo de ácido fórmico y atmósfera inerte.

**Figura 2- 21:** Plaguicidas que tuvieron un incremento en su estabilidad con el empleo de ácido fórmico y atmósfera inerte.




En la **Figura 2- 21**, es de resaltar, que para el caso de folpet se tiene un aumento de la estabilidad excepcional, considerando que en la aplicación de los tratamientos 1 y 2, no fue posible medir dicho compuesto posterior al tiempo 0, pues se degradaba rápidamente. Sumado a lo anterior, no se percibió una aparente tendencia que sugiriera la disminución de la concentración en función del tiempo.

Lo anterior, concuerda con investigaciones previas realizadas en torno a la estabilidad de estos compuestos donde, se ha encontrado que la degradación de plaguicidas que presentan en su estructura el grupo N-trihalometil como el folpet, generada por la pérdida del grupo ($-SCX_3$) se ve altamente favorecida en medios alcalinos y puede ocurrir en organismos vivos, en el ambiente, durante el almacenamiento, procesamiento y análisis de muestras. Incluso se ha reportado para este compuesto, que en solventes como el

acetonitrilo, se puede presentar degradación de hasta el 100% en cortos periodos de tiempo, lo cual puede ser contrarrestado por la adición de ácido fórmico [66], [99].

Para el caso del DDE, se encuentra que la adición de ácido fórmico eliminó la leve tendencia que se podía observar con la aplicación de exclusivamente la atmósfera inerte (ver **Figura 2- 17**), es decir, con la aplicación del fórmico y la atmósfera inerte se logró una estabilidad prácticamente ideal. Lo anterior, sugiere que como se había discutido previamente, es posible que el DDE sufra de diferentes mecanismos de degradación, el primero y más notorio es la oxidación, pero aparentemente pueden darse otros procesos como el de dehidrocloración, la cual se ve menos favorecida por la presencia de iones hidronio en el medio.

Por otro lado, carbofurano y cipermetrina fueron dos compuestos que presentaron una inestabilidad relativamente alta (ver Tratamiento 1), y que al igual que el folpet, no mostraron ninguna mejoría al emplear una atmosfera inerte (ver Tratamiento 2). Sin embargo, como se puede observar en la **Figura 2- 21**, la adición de ácido fórmico demostró su capacidad para evitar la degradación de estos dos compuestos. Para el caso del carbofurano, siendo este un N-metilcarbamato se ha encontrado que el principal mecanismo de degradación corresponde a reacciones de hidrólisis en medio básico generando como principales productos compuestos como el 3-hidroxicarbofurano y el 3-cetocarbofurano. Sin embargo, también se ha encontrado que la volatilización, fotólisis y oxidación son factores importantes en el proceso de degradación[22],[23]. Para el caso de piretroides sintéticos como la cipermetrina, se ha reportado son altamente inestables en medio básico, debido principalmente a procesos de oxidación o hidrólisis del enlace éster, a partir de esta última reacción se conoce como principal producto de degradación la formación del metabolito 3-PBA [102], [103]. En general se ha reportado que la inestabilidad de estos compuestos puede ser mitigada en medios ácidos. Lo anterior, soporta los resultados obtenidos en este estudio ya que la adición de ácido fórmico permite disminuir el pH, inhibiendo la hidrólisis de los componentes de los materiales candidato.

La siguiente tabla muestra los coeficientes de determinación $R^2$ obtenidos para cada cinética de reacción evaluada.

**Tabla 2- 14:** Coeficientes de determinación $R^2$ de los materiales adicionados con argón y ácido fórmico

| | *Compuesto* | *Coeficiente de determinación* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *Orden 0* | *Orden 1* | *Orden 2* | *Orden 3* |
| MR1 | Clorpirifos | 0,0100 | 0,0107 | 0,0114 | 0,0094 |
| | λ–Cihalotrina | 0,0151 | 0,0152 | 0,0153 | 0,0150 |
| | Tebuconazol | 0,0601 | 0,0605 | 0,0609 | 0,0598 |
| | Folpet | 0,2373 | 0,2357 | 0,2340 | 0,2390 |
| MR2 | Carbofurano | 0,1620 | 0,1587 | 0,1555 | 0,1653 |
| | DDE | 0,2373 | 0,2357 | 0,2340 | 0,2390 |
| | Dimetoato | 0,0590 | 0,0589 | 0,0587 | 0,0592 |
| | Dimetomorf | 0,3368 | 0,3355 | 0,3342 | 0,3381 |
| MR3 | Azoxistrobina | 0,0018 | 0,0018 | 0,0018 | 0,0018 |
| | β-Endosulfan | 0,1803 | 0,1778 | 0,1753 | 0,1828 |
| | Cipermetrina | 0,0442 | 0,0447 | 0,0452 | 0,0437 |
| MR4 | Bifentrina | 0,0326 | 0,0323 | 0,0321 | 0,0328 |
| | Clordano | 0,1727 | 0,1744 | 0,1761 | 0,1709 |
| | Difenoconazol | 0,0064 | 0,0067 | 0,0071 | 0,0060 |

A partir de los resultados mostrados, se puede evidenciar que la aplicación de este tratamiento de estabilización, logró mantener la concentración de todos los componentes de los materiales candidato durante los 59 días del estudio, esto teniendo en cuenta que ninguno de los compuestos presentó regresiones significativas, se obtuvieron en todos los casos coeficientes de determinación $R^2$<0,3368. Estos resultados permiten corroborar que la estabilidad de compuestos como clorpirifos, dimetoato, DDE, tebuconazol y λ-cihalotrina, la cual es influenciada principalmente por condiciones oxidativas, puede ser mejorada significativamente con el uso de atmosfera inerte; además la adición de ácido fórmico mostró un efecto positivo sobre compuestos que se habían mantenido inestables en los tratamientos anteriores, los cuales correspondieron a: folpet, carbofurano y, cipermetrina; lo anterior sugiere que la estabilidad de estos componentes puede ser principalmente afectada por el pH del medio, favoreciendo reacciones de hidrólisis.

### 2.3.4 Estimación de la incertidumbre debida a la inestabilidad de los materiales de referencia

A partir de los resultados obtenidos durante los estudios de los materiales de referencia candidatos se realizó la estimación de la incertidumbre debida a la inestabilidad $u_{est}(\%)$ de cada compuesto. Esta incertidumbre, fue estimada para los 59 días del estudio acorde con las recomendaciones de la guía ISO 35 [8]. Para ello, se tuvieron en cuenta dos aproximaciones: (i) la pendiente de la regresión en el caso en que ésta fuese significativa y, (ii) la máxima variación respecto a la concentración inicial de los componentes.

La primera aproximación fue empleada para todos los componentes que presentaron degradación ajustada a un modelo de cinética de reacción de orden 0, para ello se empleó la siguiente ecuación.

$$u_{est}(\%) = -mt \tag{2.1}$$

Donde *m* es la pendiente del modelo de regresión y *t* el tiempo del estudio en días. Para el caso del dimetoato, único compuesto que siguió una cinética de orden 1, se estimó a partir de la siguiente ecuación.

$$u_{est}(\%) = -\frac{mt}{2{,}303} \tag{2.2}$$

Y, para el caso de la cipermetrina, compuesto que siguió una cinética de orden 2, se estimó a partir de la ecuación:

$$u_{est}(\%) = mt \tag{2.3}$$

La segunda aproximación se empleó para el folpet, compuesto cuya degradación no se ajustó a ningún modelo de cinética.

$$u_{est}(\%) = \frac{|(c_0 - c_{min})|t}{\sqrt{3}\, t_{min}} \tag{2.4}$$

Donde, $c_0$ es la concentración relativa inicial del compuesto, la cual corresponde a 100% y $c_{min}$ es la mínima concentración obtenida durante el estudio y, t corresponde al tiempo del estudio en días y $t_{min}$ el tiempo en el cual se obtuvo la mínima concentración.

La siguiente tabla resume las incertidumbres asociadas a la inestabilidad de los compuestos evaluados en esta investigación.

**Tabla 2- 15**: Incertidumbres asociadas a la inestabilidad de los materiales

| *Material candidato* | *Compuesto* | *Tratamiento* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *Ambiente Oxidativo* | *Atmósfera inerte* | *Atmósfera inerte y ácido fórmico* |
| MR1 | Clorpirifos | 7,10% | 0,43% | 0,24% |
| | Cihalotrina | 10,46% | 0,21% | 0,10% |
| | Tebuconazol | 5,45% | 0,23% | 0,27% |
| | Folpet | 57,74% | 57,74% | 0,20% |
| MR2 | Carbofurano | 12,13% | 15,48% | 0,21% |
| | DDE | 10,53% | 1,06% | 0,20% |
| | Dimetoato | 9,09% | 0,12% | 0,21% |
| | Dimetomorf | 0,24% | 0,18% | 0,10% |
| MR3 | Cipermetrina | 11,85% | 15,07% | 0,28% |
| | b-Endosulfan | 0,10% | 0,12% | 0,22% |
| | Azoxistrobina | 0,17% | 0,12% | 0,23% |
| MR4 | Difenoconazol | 0,12% | 0,13% | 0,21% |
| | Bifentrina | 0,15% | 0,14% | 0,11% |
| | Clordano | 0,20% | 0,11% | 0,22% |

Como se discutió previamente, ocho de los 14 plaguicidas evaluados presentaron cambios en su concentración en función del tiempo al ser sometidos a un ambiente oxidativo. Como se puede observar en la tabla anterior, estos compuestos presentaron incertidumbres asociadas a la inestabilidad entre 5,45% y 57,74%, correspondientes a tebuconazol y folpet. Por su parte, los compuestos que no presentaron cambios significativos en su concentración, tuvieron incertidumbres entre 0,10% y 0,24%, los cuales correspondieron a b-endosulfan y dimetomorf, respectivamente. Igualmente, se estimó la incertidumbre para

el compuesto control (PCB), el cual es estable en todos los materiales y condiciones, obteniendo incertidumbres de máximo 0,26%.

Por otro lado, la saturación de los materiales con argón permitió que el 62% de los componentes que se habían mostrado como inestables, mantuvieran su concentración durante todo el estudio. La efectividad de este tratamiento para estabilizar especialmente, los componentes susceptibles a oxidación se vio reflejada en los valores de incertidumbre obtenidos, los cuales se encontraron entre 0,12% y 1,06%, para el Dimetoato y DDE, respectivamente; significando una disminución en la incertidumbre de hasta 76 veces. Este tratamiento, no presentó influencia positiva sobre la estabilidad de plaguicidas como el folpet, carbofurano y cipermetrina, los cuales se mantuvieron inestables con incertidumbres similares a las obtenidas en el primer tratamiento. Finalmente, la adición del los candidatos con ácido fórmico y posterior saturación con argón, permitió no solo mantener estables los componentes oxidables confirmando los resultados previos si no que también, logró incrementar la estabilidad de los plaguicidas sensibles a reacciones de hidrólisis permitiendo obtener incertidumbres de máximo 0,41%, valor que concuerda con los obtenidos para los plaguicidas que presentaron estabilidad. Este tratamiento se mostró efectivo, incluso para el folpet representando una disminución en su incertidumbre de aproximadamente 289 veces, pasando de 57,74% a 0,20%.

## 2.4 Conclusiones

Para la determinación de plaguicidas en materiales de referencia de soluciones calibrantes se desarrollaron cuatro metodologías analíticas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El desempeño de las metodologías fue demostrado a través de la validación de parámetros como selectividad, linealidad y precisión como repetibilidad, encontrándose que los parámetros de desempeño de los métodos permiten determinar los componentes de los materiales de referencia de manera selectiva y precisa, encontrándose acorde con el uso previsto. La incertidumbre de la medición obtenida para cada plaguicida cumplió con el requisito establecido $u_{obj}$:1%, siendo máximo de 0,90%. Estos resultados permitieron evidenciar que los métodos desarrollados son aptos para la evaluación de la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas en soluciones calibrantes.

Se aplicaron los tratamientos de estabilización a cuatro materiales de referencia producidos. Los resultados de los estudios de estabilidad de los materiales sometidos al ambiente oxidativo, permitieron establecer evidencias acerca de la inestabilidad química de 8 de los 14 compuestos evaluados, correspondientes a: clorpirifos, folpet, tebuconazol, λ-cihalotrina, dimetoato, DDE, cipermetrina y carbofurano, obteniéndose incertidumbres asociadas a su inestabilidad entre 5,45% y 57,74%.

El uso de atmósfera de argón, demostró tener la capacidad de incrementar la estabilidad de componentes susceptibles a sufrir procesos oxidación; para el caso de compuestos como clorpirifos, tebuconazol, λ-cihalotrina, dimetoato y DDE, una vez aplicado este tratamiento se lograron incertidumbres hasta 76 veces menores a las obtenidas sin la adición de argón. Igualmente, la adición de ácido fórmico en los materiales, logró inhibir la hidrólisis de componentes como folpet, carbofurano y cipermetrina, manteniéndose estables bajo las condiciones evaluadas, significando una mejora en su incertidumbre de hasta 286 veces. Estos resultados, evidencian que el uso de estos aditivos permiten incrementar la estabilidad de estos plaguicidas incluso a condiciones severas de temperatura (50 ºC) durante dos meses. Además, a partir de estos resultados se pudieron establecer las condiciones adecuadas de preparación de los candidatos de modo que se pueda asegurar la obtención de materiales suficientemente estables, viabilizando su producción como materiales de referencia certificados.

# 3. Empleo de alternativas de estabilización de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate *(Persea americana)*

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la estabilización de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate mediante diferentes alternativas, las cuales correspondieron a: (i) liofilización, (ii) uso de aditivos, (iii) y (iv) encapsulación con maltodextrina, maltodextrina y goma arábiga y (v) el encapsulado empleando secado por aspersión. Los resultados obtenidos indicaron que plaguicidas como azoxistrobina, dimetoato, metamidofos, entre otros tienen una baja estabilidad en la matriz de aguacate liofilizado. Por otro lado, al emplear aditivos y procesos de encapsulación, se logró mejorar la estabilidad de los plaguicidas sensibles a degradación y se obtuvieron incertidumbres debidas a la estabilidad inferiores al 2% para la mayoría de los compuestos evaluados.

## 3.1 Introducción

A nivel mundial, cientos de sustancias activas de diferentes familias químicas son comúnmente usadas para la protección de las plantas y cultivos [104]. Sin embargo, el uso de estos fitosanitarios en cultivos alimentarios o forrajeros pueden representar un riesgo para la salud pública, por lo que se han establecido diferentes marcos regulatorios a nivel mundial que definen las reglas para la aprobación de sustancias activas, el uso de las formulaciones y, los residuos de plaguicidas en alimentos. Este último aspecto, tiene una gran influencia sobre la economía global ya que los residuos de plaguicidas son uno de los contaminantes que mayor número de notificaciones sanitarias genera en productos como frutas y vegetales, debido a que exceden los limites máximos de residuos permitidos, impidiendo con ello, el ingreso de estos productos a mercados internacionales[105], [106]. Es por esta razón que, para asegurar la protección de los consumidores, es indispensable contar con metodologías analíticas confiables que permitan la detección, identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas en alimentos.

El análisis de plaguicidas en alimentos involucra grandes desafíos analíticos, debido a la amplia cantidad de analitos con diferentes propiedades que se analizan a bajas concentraciones de manera prácticamente simultánea [107]; su determinación es un proceso que requiere etapas de pretratamiento de las muestras, etapas de extracción y limpieza, así como metodologías analíticas altamente selectivas para su determinación, por lo anterior y sumado al alto impacto socioeconómico de este tipo de mediciones, se hace necesario contar laboratorios altamente competentes, lo cual se traduce en laboratorios acreditados.

La validación de métodos, la participación en ensayos de aptitud y el establecimiento de cadenas de trazabilidad metrológica, son algunos de los requisitos técnicos que mayores retos implican para los laboratorios; estos tres aspectos tienen en común que requieren el uso de materiales de referencia [37],[76]. Desafortunadamente, la disponibilidad de los MR de este tipo es limitada, lo cual ocurre principalmente por los problemas de estabilidad y homogeneidad de este tipo de materiales.

La estabilidad es una característica especialmente importante de los MR dado que, cualquier variación potencial de los valores, resultado de la inestabilidad de los analitos o

la matriz durante la vida útil del material, dificulta el proceso de obtención de MR [11],[108]. Por lo anterior, los productores de materiales de referencia (PMR) han empleado diferentes tratamientos que permitan mejorar la estabilidad de los materiales, especialmente cuando involucran matrices alimenticias y biológicas. Dentro de estos tratamientos se destacan, el secado de la matriz, el uso de tratamientos térmicos, radiación gamma, esterilización y, en algunos casos el uso de antioxidantes, sin embargo, para el caso de analitos de naturaleza orgánica, el uso de estos tratamientos puede afectar de manera negativa su estabilidad [109], resultando ser una limitante importante en la producción de este tipo de MR [2].

Con el fin de contribuir con las necesidades de nuestro país en materia de medición, y reconociendo la importancia de contar con MR de plaguicidas en matriz, que puedan ser empleados como herramientas de que permiten el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición de los laboratorios nacionales, el presente capitulo centra su atención en el estudio de diferentes métodos o tratamientos empleados para la producción de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate *Hass*, que permitan incrementar la estabilidad de plaguicidas seleccionados en materiales de referencia.

## 3.2 Experimental

### 3.2.1 Reactivos

Las soluciones madre empleadas durante esta investigación fueron preparadas a partir de estándares de plaguicidas obtenidos de Dr. Ehrenstorfer; en todos los casos la pureza reportada por el fabricante fue de mínimo el 98%. Todas las soluciones se almacenaron a -20 ºC en recipientes de vidrio ámbar, hasta su uso. Los reactivos empleados para la preparación de soluciones estándar y en la medición de los plaguicidas de las muestras fueron obtenidos de casas comerciales como Merck, Sigma Aldrich y United Chemical Technologies. El metabisulfito de sodio, ácido ascórbico, maltodextrina y goma arábiga, empleados como aditivos y matrices encapsulantes, fueron grado farmacéutico y alimenticio (USP) y se obtuvieron de un productor nacional.

El aguacate empleado como materia prima para la producción de los candidatos a materiales de referencia fue obtenido en una plaza de mercado de la ciudad de Bogotá D.C.

### 3.2.2 Instrumentos y equipos

Todas las preparaciones y diluciones se llevaron a cabo de manera gravimétrica empleando las balanzas analíticas Mettler Toledo XPE504 y XPE204, las cuales cuentan con una resolución de 0,01 mg; una balanza Mettler Toledo XP4002S de resolución de 0,01 g y, una báscula Mettler Toledo de resolución de 0,001 kg. Todos los instrumentos de pesaje fueron calibrados por el Instituto Nacional de Metrología de Colombia y verificados previo su uso.

Para la producción de los candidatos se emplearon procesadores de alimentos de uso doméstico. La homogenización del material se realizó de manera mecánica empleando un Gyromixer, mientras que los procesos de secado[2] se realizaron empleando un equipo de secado por aspersión GEA Mobile MINOR® operado bajo las condiciones reportadas reportadas por [110] y, un liofilizador Labconco™ FreeZone™, operado a -84 ºC y una presión de 3100 Pa, aproximadamente.

La medición de los plaguicidas se realizó a través de un cromatógrafo ExionLC AD SCIEX acoplado a un espectrómetro de masas SCIEX QTRAP™ 4500, equipado con una fuente de ionización por electrospray operada en modo positivo (ESI+, de sus siglas en inglés).

[2] El proceso de secado por aspersión fue subcontratado.

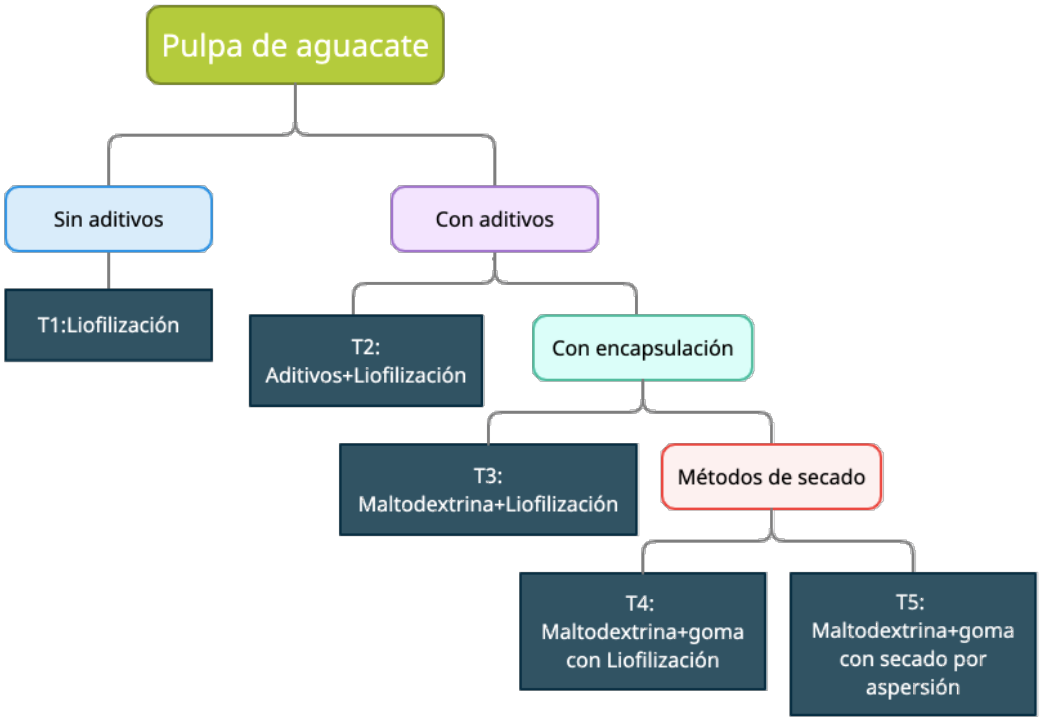
### 3.2.3 Tratamientos estudiados

Con el propósito de incrementar la estabilidad de los residuos de plaguicidas en la matriz de aguacate, se evaluaron cinco tratamientos. Para ello, a partir del aguacate adquirido en mercados locales, se prepararon cinco lotes de MR (ver 3.2.4); los cuales se sometieron a cada uno de los siguientes tratamientos:

- ***T1:*** liofilización del material, a partir de este tratamiento se busca establecer la línea base para la presente investigación; es decir, a partir de estos resultados se establecen los analitos más inestables y se realiza la estimación de la incertidumbre asociada a este efecto.
- ***T2:*** uso de aditivos, para lo cual se empleó ácido ascórbico (1 % p/p) y metabisulfito de sodio (0,1%). Con este tratamiento se busca estabilizar la matriz o los analitos protegiéndolos de procesos de oxidación y degradación microbiana.
- ***T3:*** uso de aditivos y encapsulado del material con maltodextrina (vía liofilización). Con este tratamiento se buscan conservar las propiedades fisicoquímicas del material a través del empleo de membranas que impidan el intercambio del material con oxígeno y evite su degradación.
- ***T4:*** uso de aditivos y encapsulado del material con maltodextrina y goma arábiga (vía liofilización).
- ***T5:*** uso de aditivos y encapsulado del material con maltodextrina y goma arábiga (vía secado por aspersión). Con este tratamiento se busca evaluar la influencia del tipo de secado sobre el material adicionado y encapsulado.

La **Figura 3- 1** presenta un esquema general de los tratamientos evaluados.

**Figura 3- 1:** Tratamientos de estabilización estudiados




## 3.2.4 Producción de los materiales de referencia

El proceso de producción de los candidatos se realizó en diferentes etapas, las cuales se describen a continuación.

- *Solución de fortificación*

Los plaguicidas evaluados durante el estudio corresponden a compuestos pertenecientes a diferentes familias químicas; estos compuestos fueron seleccionados teniendo en cuenta: (i) la estabilidad reportada en la literatura [88], (ii) el interés del Instituto Nacional de Metrología y, (iii) su registro de uso para el cultivo de aguacate. Los analitos seleccionados para este estudio, la concentración de la mezcla de fortificación y su incertidumbre son presentados en la **Tabla 3- 1**.

**Tabla 3- 1**: Plaguicidas seleccionados y concentraciones de la mezcla de fortificación

| Analito | Concentración (mg/kg) | $u_{relativa}$ (%) |
|---|---|---|
| Abamectina | 0,276 | 0,044% |
| Acetamiprid | 0,246 | 0,050% |
| Alacloro | 0,279 | 0,046% |
| Azoxistrobina | 0,299 | 0,042% |
| Benalaxil | 1,404 | 0,009% |
| Difenoconazol | 3,181 | 0,004% |
| Dimetoato | 0,242 | 0,057% |
| Dimetomorf | 0,294 | 0,048% |
| Flutriafol | 0,265 | 0,049% |
| Malation | 0,584 | 0,044% |
| Metamidofos | 0,261 | 0,048% |
| Monocrotofos | 0,322 | 0,038% |
| Spirodiclofen | 0,226 | 0,046% |
| Spiromesifen | 0,256 | 0,042% |
| Spinosin-A | 0,275 | 0,039% |
| Spinosin-D | 0,271 | 0,008% |
| Tebuconazol | 0,276 | 0,004% |
| Tiacloprid | 0,235 | 0,035% |
| Tiametoxam | 3,116 | 0,004% |
| Trifloxistrobina | 0,289 | 0,042% |

Para realizar la preparación de los materiales se partió de tres soluciones o mezclas, correspondientes a (i) la solución de fortificación (**Tabla 3- 1**), (ii) la solución estabilizante y, (iii) la mezcla de matriz encapsulante.

- *Pretratamiento y homogenización del aguacate*

Con el fin de obtener la pulpa de aguacate empleada para la producción de los lotes de MR, se emplearon 40,25 kg de aguacate variedad *Hass.* Se seleccionaron las unidades visiblemente sanas y que se encontraran en un estado de madurez de ruptura. Cada unidad fue lavada con agua desionizada para retirar cualquier suciedad de la superficie y fue secada a temperatura ambiente en cabina de flujo laminar. La **Figura 3- 2** muestra el material de partida empleado para la producción.

**Figura 3- 2:** Aguacate hass adquirido para la producción de los candidatos

Una vez seco el aguacate, se extrajo la pulpa y se procesó. Debido a la capacidad del procesador, fue necesario realizar el procesamiento en pequeños lotes. Con el fin de asegurar la homogenización, se realizó agitación manual y mecánica en un agitador giroscópico Gyromixer®. La **Figura 3- 3** muestra el proceso de obtención de la pulpa.

**Figura 3- 3:** Obtención de la pulpa de aguacate

Finalmente, se obtuvieron 24,96 kg de pulpa de aguacate homogenizada, para un rendimiento respecto a la masa inicial del material del 62%.

- *Preparación de los lotes de materiales de referencia*

A partir de la pulpa obtenida se realizó la preparación de cada lote de MR con la aplicación de los tratamientos de estudio (ver 3.2.3 y **Figura 3- 1**), la producción se muestra en la **Figura 3- 4.**

*Tratamiento 1:* se tomó una porción de aproximadamente 4 kg de pulpa y se fortificó con 200 g de la Solución de fortificación, se agitó de manera mecánica para asegurar la homogenización empleando una batidora de inmersión. La mezcla obtenida fue almacenada a -80 ºC hasta iniciar su proceso de secado a través de liofilización.

*Tratamiento 2:* con la pulpa obtenida, se realizó una mezcla en relación de 5 a 1 con la solución estabilizante (1% de ascórbico y 0,1% de metabisulfito de sodio), la cual se agitó hasta obtener un material homogéneo. Se separó una porción de 2 kg de la pulpa estabilizada con el fin de ser empleada como blanco de matriz. Posteriormente, se procedió a fortificar con la Solución de fortificación, se homogenizó nuevamente con ayuda del Gyromixer, se almacenó a -80 ºC y finalmente se liofilizó.

*Tratamiento 3:* a partir de la pulpa obtenida, se realizó una mezcla de 5 kg de pulpa, 1 kg con la solución estabilizante (1% de ascórbico y 0,1% de metabisulfito de sodio) y 250 g de Solución de fortificación; este mezcla se agitó hasta obtener un material visiblemente homogéneo. Posteriormente, se procedió a adicionar 6,25 kg de una solución de maltodextrina (20% p/p), se sometió nuevamente a homogenización y, se almacenó a -80 ºC para posteriormente liofilizar.

*Tratamiento 4:* a partir de la pulpa obtenida, se realizó una mezcla de 5 kg de pulpa, 1 kg con la solución estabilizante (1% de ascórbico y 0.1% de metabisulfito de sodio) y 250 g de la mezcla de plaguicidas, la cual se agitó hasta obtener un material visiblemente homogéneo. Posteriormente, se procedió a adicionar 6,25 kg de una solución de maltodextrina (20% p/p) y goma arábiga (5% p/p), se sometió nuevamente a homogenización y, se almacenó a -80 ºC para posteriormente liofilizar.

*Tratamiento 5:* a partir de la pulpa obtenida, se realizó una mezcla de 5 kg de pulpa, 1 kg con la solución estabilizante (1% de ascórbico y 0,1% de metabisulfito de sodio) y 250 g de la mezcla de plaguicidas, la cual se agitó hasta obtener un material homogéneo. Posteriormente, se procedió a adicionar 6,25 kg de una solución de maltodextrina (20%

p/p) y goma arábiga (5% p/p), se sometió nuevamente a homogenización y, se almacenó a -80 ºC para posteriormente someterse a secado por aspersión.

**Figura 3- 4:** Proceso de producción de los candidatos a materiales de referencia

- *Envasado*

Una vez eliminada el agua de los diferentes materiales a través de los procesos de liofilización o secado por aspersión, se realizó el proceso de envasado. Para ello, y con el fin de asegurar una mayor homogeneidad, cada lote fue molido, agitado y tamizado (se colectó la fracción menor a 500 μm). Para el proceso de envasado, se dispensaron 20 g de cada material en botellas de polietileno de alta densidad (PEAD) ámbar con capacidad nominal de 100 mL. La **Figura 3- 5** muestra el proceso de envasado del material.

**Figura 3- 5:** Proceso de envasado de los materiales de referencia

Se produjeron aproximadamente 30 unidades de cada lote, uno por cada tratamiento. Cada unidad fue etiquetada y almacenada en bolsas de polietileno selladas al vacío y, finalmente

empacadas en bolsas aluminizadas Mylar® para protegerlas de la luz. La **Figura 3- 6** muestra la presentación final de los materiales.

**Figura 3- 6:** Presentación final de los materiales de referencia

## 3.2.5 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad fueron llevados a cabo a través de un diseño isócrono [8]. Para realizar este estudio, cada lote del material se dispuso en una cámara climática a 50 ºC. Posteriormente, en los días 0, 8, 28, 39 y 45 se tomaron dos unidades de cada lote de material y se almacenaron a -80 ºC, la cual correspondió a la temperatura de referencia del estudio.

Una vez concluido el estudio, se retiraron todas las muestras del ultra congelador, se dejaron a temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio térmico y se procedió a realizar la medición de los plaguicidas a través del método descrito en el numeral 3.2.6.

### 3.2.6 Medición de plaguicidas

La determinación de los plaguicidas evaluados en este capitulo, fue llevada a cabo a través de cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MSMS, de sus siglas en inglés), empleando una metodología previamente desarrollada y validada en el Instituto Nacional de Metrología de Colombia.

Para ello, inicialmente se realizó la reconstitución del material adicionando 6 g $\pm$ 0,05 g de agua ultrapura por cada 3 g $\pm$ 0,05 g del material y agitando vigorosamente hasta obtener una pulpa homogénea sin partículas sólidas visibles. Posteriormente, se extrajeron los analitos empleando la metodología basada en el método QuEChERS [111]. El extracto obtenido fue filtrado, fortificado con la mezcla de estándares internos y diluido con la fase móvil. Se realizaron al menos dos extracciones por unidad y cada extracto fue medido por triplicado en el instrumento. Todas las mediciones se realizaron bajo condiciones de repetibilidad. La estabilidad de los analitos en los materiales fue evaluada mediante un análisis de regresión lineal (y=mx+b) y la incertidumbre debida a la inestabilidad fue estimada acorde con las recomendaciones de la Guía ISO 35 (ver sección 2.3.4).

La separación cromatográfica de los analitos se realizó empleando una columna ThermoSientific™ Acclaim™ 120 de fase reversa C18 de 100 mm x 2,1 mm de diámetro interno y 2,2 μm de tamaño de partícula, operada a 40 ºC. Se emplearon como fase móvil agua desionizada (A) y metanol (B), adicionados con ácido fórmico al 0,1% y formiato de amonio 5mM. El gradiente inició con 5% de fase B hasta 1 min, aumentando de manera lineal hasta 7% de B, posterior incremento en el minuto 1,10 hasta 30% de B y, alcanzando un 62% de B al minuto 7,00. Se incremento la proporción hasta un 100% de B en el minuto 14, manteniéndose 1,5 min; la proporción de B disminuyó de manera lineal hasta 25% (16 min), 10% al minuto 19, alcanzando al minuto 21 las condiciones iniciales. El tiempo total de medición fue de 21 min. El flujo se mantuvo constante a 0,3 mL/min, y el volumen de inyección fue de 5 μL. La detección se realizó empleando una fuente de ionización por electrospray operada en modo positivo (ESI+). Se empleó el modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM). Se empleó una presión de gas cortina de 172 kPa; el gas de colisión se mantuvo en 60 (unidades arbitrarias). El voltaje de atomización se mantuvo en 5000 V a una temperatura de 400 ºC. Se empleó nitrógeno como gas cortina y de colisión.

El control del instrumento, adquisición y procesamiento de resultados fue realizado empleando el software Analyst.

El desempeño del método fue demostrado a través de la validación de parámetros como selectividad, precisión bajo condiciones de repetibilidad, linealidad, sesgo como porcentaje de recuperación y limites de cuantificación. La incertidumbre de medición para los plaguicidas fue inferior al 3,20%. La **Tabla 3- 2** a continuación resume los parámetros de validación de mayor relevancia para esta investigación, así como su respectiva incertidumbre de medición.

**Tabla 3- 2:** Características de desempeño del método de medición

| *Compuesto* | *Intervalo lineal (µg/kg)* | | *% Recuperación* | $u_{relativa}$ *(%)* |
|---|---|---|---|---|
| Abamectina | 0,523 | 50,827 | 95,27% | 3,05% |
| Acetamiprid | 0,541 | 52,56 | 93,48% | 0,99% |
| Alacloro | 0,545 | 53,007 | 94,96% | 1,64% |
| Azoxistrobina | 0,538 | 52,288 | 99,28% | 0,57% |
| Benalaxil | 0,525 | 51,062 | 87,42% | 0,82% |
| Clorpirifos | 0,545 | 52,962 | 103,31% | 1,91% |
| Difenoconazol | 0,539 | 52,416 | 82,66% | 2,13% |
| Dimetoate | 0,523 | 50,859 | 94,33% | 0,93% |
| Dimetomorf | 0,516 | 50,126 | 91,42% | 0,84% |
| Flutriafol | 0,520 | 50,521 | 97,47% | 0,49% |
| Malation | 0,527 | 51,272 | 92,22% | 0,44% |
| Metamidofos | 0,560 | 54,388 | 75,68% | 0,97% |
| Monocrotofos | 0,590 | 57,342 | 85,69% | 1,08% |
| Propamocarb | 0,523 | 50,854 | 49,59% | 1,82% |
| Spirodiclofen | 0,451 | 43,845 | 100,65% | 2,29% |
| Spiromesifen | 0,495 | 48,113 | 79,32% | 2,52% |
| Spinosin-a | 0,495 | 48,113 | 69,74% | 1,39% |
| Spinosin-d | 0,519 | 50,461 | 87,48% | 3,20% |
| Tebuconazol | 0,509 | 49,444 | 107,08% | 1,32% |
| Tiacloprid | 0,511 | 49,659 | 96,63% | 0,70% |
| Tiametoxam | 0,520 | 50,582 | 112,03% | 0,74% |
| Trifloxistrobina | 0,551 | 53,563 | 88,30% | 2,21% |

## 3.3 Resultados

En concordancia con la Guía ISO 35 y con el propósito de evaluar la preparación y el proceso de medición de los diferentes lotes producidos, a partir de los resultados de la medición de los residuos de plaguicidas, se procedió a realizar los respectivos análisis de tendencias. La evaluación de estas tendencias busca determinar si los procesos (preparación y medición) presentan alguna deriva que posteriormente puedan interferir durante la evaluación de la estabilidad del material de referencia.

La evaluación de tendencia en medición se realizó a través de un análisis de regresión (respuesta instrumental vs el número de medición); mientras que, la evaluación de la tendencia en preparación se realiza aplicando un análisis de regresión de la respuesta instrumental en función del número de botella que se envasó. En el análisis de regresión se obtuvo que para ningún caso existe una regresión significativa ($\alpha$=0,05), por lo cual se puede concluir que el proceso de medición y preparación del material no afecta el estudio de estabilidad y los análisis de regresión que se emplearán para su evaluación.

Posteriormente, con el propósito de determinar el efecto de los diferentes tratamientos estudiados (ver 3.2.3), se procedió a evaluar la estabilidad del material de referencia, para lo cual se evaluó el comportamiento de la concentración en función del tiempo de cada uno de los estudios de estabilidad. Nuevamente, a través del análisis de regresión para modelos cinéticos de orden cero, uno y dos, se evalúo objetivamente si los tratamientos empleados estabilizaron el material de referencia.

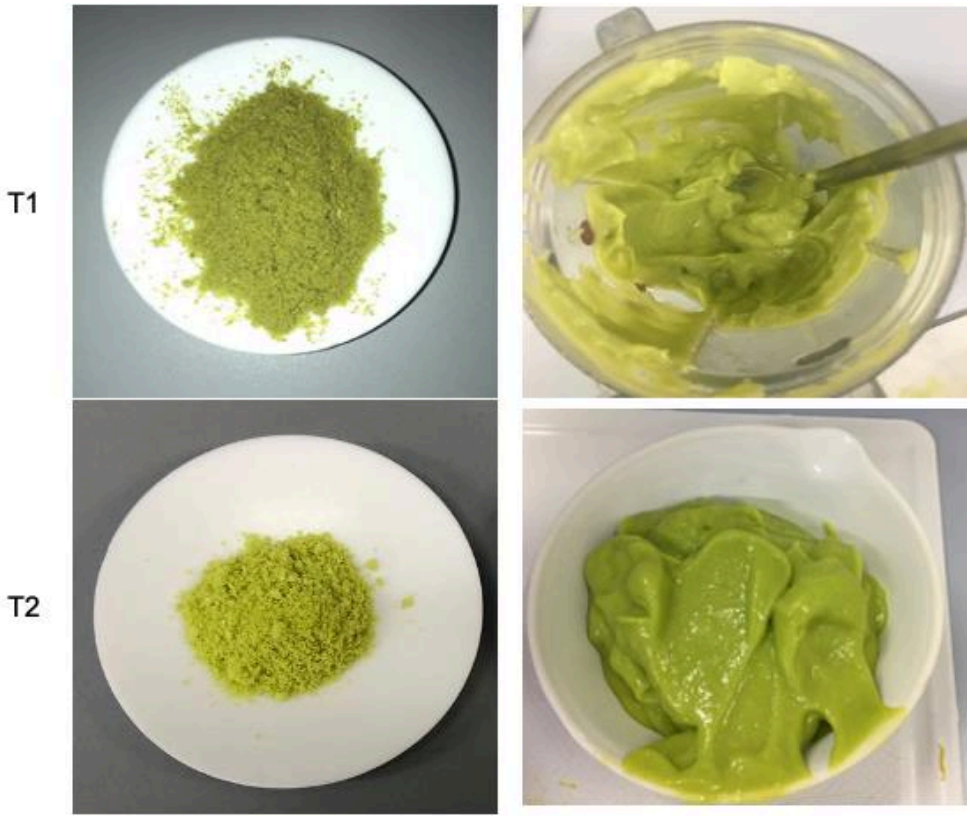
En las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad para cada uno de los tratamientos.

### 3.3.1 Liofilización y uso de aditivos

Como se mencionó en el numeral 3.2.3, el primer tratamiento (T1) consistió en realizar la liofilización del material y, el segundo tratamiento (T2) consistió en adicionar ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y, posteriormente liofilizar. La **Figura 3- 7** muestra los materiales obtenidos al aplicar estos dos primeros tratamientos. Para el caso de T1 se observó que, durante la liofilización, la superficie expuesta al ambiente presentó

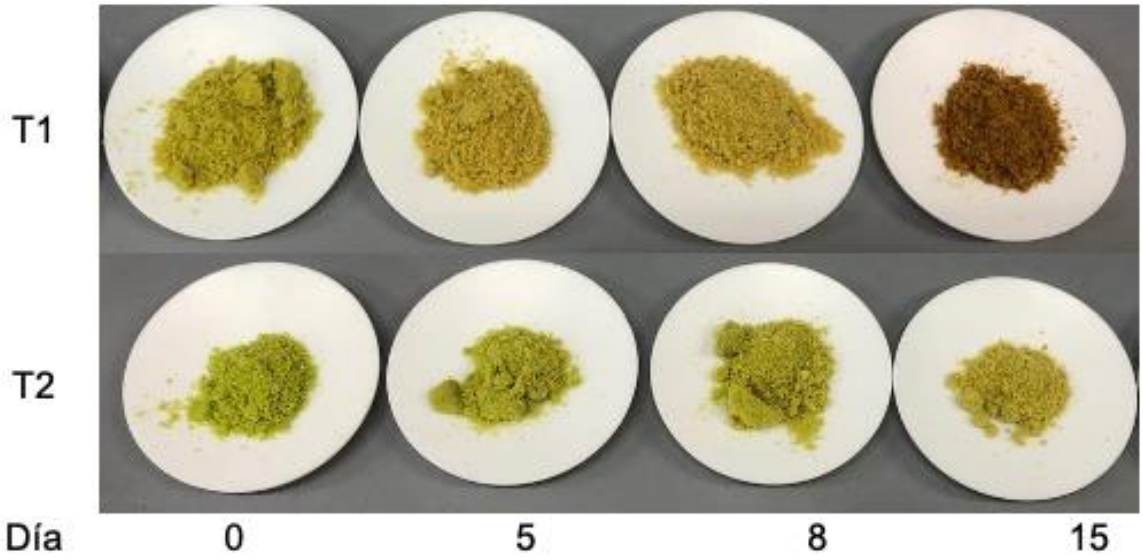
oscurecimiento, así mismo el material final obtuvo una coloración levemente más oscura respecto al material de partida inicial; por el contrario, el material T2 no presentó cambios visibles en su coloración, la cual siempre se mantuvo similar a la del material de partida. Los dos materiales, presentaron una apariencia grasosa y eran altamente higroscópicos; sin embargo, al ser reconstituidos, se obtuvo un material muy similar al de la pulpa de aguacate fresca.

**Figura 3- 7:** Materiales de referencia obtenidos para T1 y T2 (izquierda) y posterior a la reconstitución con agua (derecha)




Los estudios de estabilidad correspondientes a los tratamientos T1 y T2 se realizaron durante un periodo 15 días, lo anterior considerando algunos estudios preliminares, que demostraron una rápida degradación de la matriz bajo las condiciones evaluadas. La **Figura 3- 8** muestra la apariencia de la matriz para cada uno de los tiempos el tiempo evaluados.

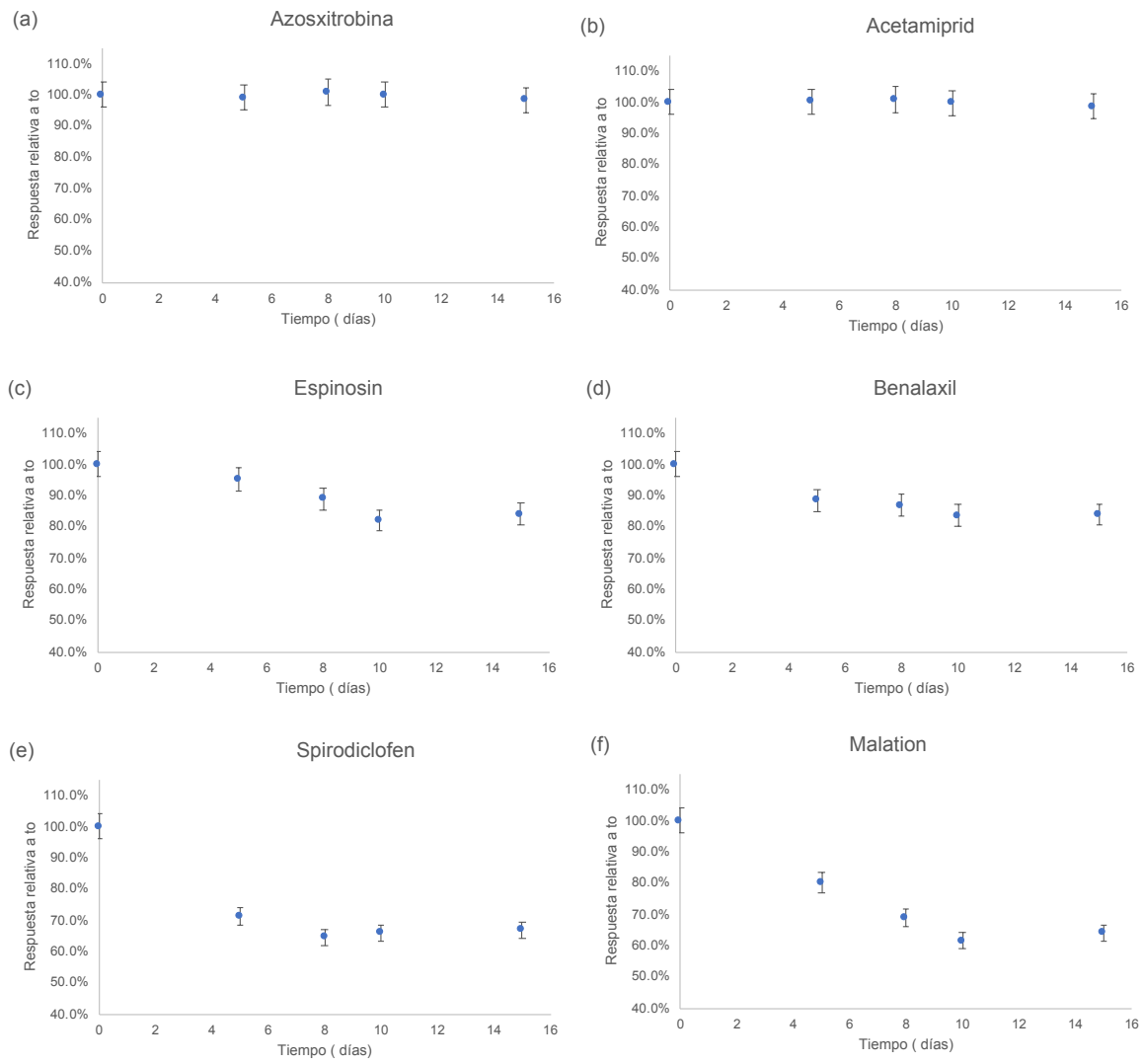
**Figura 3- 8:** Registro fotográfico del estudio de estabilidad para T1 y T2




Como se puede observar en la **Figura 3- 8**, de manera preliminar se evidencia el efecto de los aditivos sobre la estabilidad de la matriz, ya que la adición del ácido ascórbico (T2) evita notablemente la oxidación de la misma durante el tiempo del estudio. Es importante resaltar, que este efecto se atribuye al ascórbico y no al metabisulfito de sodio, pues este último tiene un efecto anti fúngico y bactericida.

La **Figura 3- 9** muestra las curvas de estabilidad obtenidas para algunos plaguicidas seleccionados, las cuales representan el comportamiento de los analitos en el material correspondiente al T1. Los resultados obtenidos en este estudio (T1), permiten identificar tres tipos de comportamiento: (i) plaguicidas estables (representados en las figuras a y b); (ii) plaguicidas medianamente estables, los cuales tienen una degradación cercana al 20% en los 15 días (representados en las figuras c y d); y plaguicidas inestables, los cuales tienen una degradación cercana al 50% en los 15 días del estudio (representados en las figuras e y f).

**Figura 3- 9:** Estabilidad de plaguicidas seleccionados al aplicar el tratamiento 1 (T1)




Es importante mencionar, que la fracción másica de los analitos depende de la cantidad de plaguicida y la cantidad de matriz, por lo cual a partir de los resultados presentados en la **Figura 3- 8** , se puede inferir que la inestabilidad de la matriz no es detectada a través de la técnica de monitoreo, pues en las figuras a y b de la **Figura 3- 9** se evidencia la estabilidad de acetamiprid y azoxistrobina; es decir al encontrar que estos compuestos son estables se evidencia que el pardeamiento o el cambio de color presentado en la **Figura 3- 8**, no afecta la fracción másica de los plaguicidas. Por otro lado, para que se pudiera detectar un cambio en la fracción másica asociado a la variación de la matriz , se requiere de por lo menos un cambio de aproximadamente 1 g en la masa de la matriz, lo cual generaría un cambio cercano al 3%. Por lo anterior, se puede indicar que los

comportamientos en los que se evidencia un decrecimiento en la concentración de los diferentes analitos, se debe exclusivamente a los cambios en la cantidad de plaguicida y no a los cambios en la matriz.

Igualmente, es de resaltar que la estabilidad que se presenta para azoxistrobina coincide con los resultados encontrados en el capítulo anterior, lo cual confirma que el comportamiento observado en la **Figura 3- 9** corresponde efectivamente a procesos de degradación de los compuestos y no de la matriz.

Como se mencionó anteriormente, se evaluaron diferentes modelos cinéticos con el propósito determinar de estimar la respectiva constante cinética y posteriormente con esta, estimar su respectivo aporte a la incertidumbre del material.

En la evaluación del ajuste de los modelos a los resultados obtenidos, se encontró que sólo 6 de los 22 compuestos que se incluyeron en este estudio se mantuvieron estables, es decir, no presentaron alguna variación en su concentración, bajo las condiciones del experimento. Los compuestos restantes, presentaron una regresión significativa ($\alpha$= 0,05) para el modelo cinético de orden cero, a excepción de metamidofos y dimetoato los cuales se ajustaron a un modelo cinético de orden 1. La **Tabla 3-3** presenta la cinética encontrada para cada compuesto, los coeficientes de determinación ($R^2$) y la incertidumbre estimada para la estabilidad del material.

**Tabla 3- 3:** Resultados obtenidos en la evaluación de las cineticas de reacción e incertidumbre debida a la estabilidad de T1 y T2

| *Compuesto* | *Orden de Cinética* | *Coeficiente de determinación ($R^2$)* | | *$u_{est}$(%) (t= 8 d)* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *T1* | *T2* | *T1* | *T2* |
| Abamectina | No hubo ajuste | 0,0097 | 0,0033 | 3,90% | 4,46% |
| Acetamiprid | No hubo ajuste | 0,3599 | 0,0191 | 0,55% | 0,27% |
| Alacloro | Cero | 0,9931 | 0,5960 | 3,90% | 2,67% |
| Azoxistrobina | No hubo ajuste | 0,0640 | 0,0680 | 0,96% | 1,11% |
| Benalaxil | Cero | 0,9429 | 0,2974* | 12,69% | 1,39% |
| clorpirifos | Cero | 0,9835 | 0,7061 | 29,32% | 3,72% |
| Difenoconazol | Cero | 0,8159 | 0,3940* | 8,39% | 1,41% |
| Dimetoato | Uno | 0,8759 | 0,9575 | 86,20% | 35,52% |
| Dimetomorf | Cero | 0,7936 | 0,0015* | 2,70% | 0,48% |
| Flutriafol | No hubo ajuste | 0,1303 | 0,1470 | 2,98% | 0,59% |

**Tabla 3-3:** (Continuación)

| *Compuesto* | *Orden de Cinética* | *Coeficiente de determinación ($R^2$)* | | *$u_{est}$(%) (t= 8 d)* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *T1* | *T2* | *T1* | *T2* |
| Malation | Cero | 0,9997 | 0,9649 | 30,80% | 3,39% |
| Metamidofos | Uno | 0,8774 | 0,9010 | 86,04% | 39,71% |
| Monocrotofos | Cero | 0,7744 | 0,5502 | 79,34% | 15,83% |
| Propamocarb | No hubo ajuste | 0,2036 | 0,2052 | 40,72% | 9,30% |
| Spirodiclofen | Cero | 0,8768 | 0,6868 | 28,65% | 7,39% |
| Spiromesifen | No hubo ajuste | 0,1757 | 0,0026 | 12,89% | 4,82% |
| Spinosin-A | Cero | 0,9248 | 0,0044* | 13,61% | 2,65% |
| Spinosin-D | Cero | 0,9410 | 0,1938* | 15,47% | 1,46% |
| Tebuconazol | Cero | 0,9992 | 0,5601 | 12,48% | 1,69% |
| Tiacloprid | Cero | 0,7301 | 0,6711 | 0,66% | 0,82% |
| Tiametoxam | Cero | 0,9422 | 0,8337 | 3,18% | 2,05% |
| Trifloxistrobina | Cero | 0,8822 | 0,9742 | 2,18% | 2,59% |

*No hay regresión significativa (p>0,05)

Los resultados presentados en la **Tabla 3- 3**, permiten evidenciar que los compuestos que no se ajustaron a ningún modelo cinético, presentaron una estabilidad adecuada para los dos tratamientos evaluados (liofilización y liofilización con aditivos); lo anterior, no sólo indica que los compuestos son estables, sino que el uso de aditivos no afecta su estabilidad. Por otro lado, en esta misma tabla, se puede apreciar que compuestos como benalaxil, difenoconazol, spinsosin y dimetomorf tuvieron un descenso considerable en el $R^2$ del modelo, hasta tal punto que el modelo cinético dejo de ser significativo (p>0,05), es decir los aditivos mejoraron notablemente la estabilidad de estos compuestos.

Por otro lado, las últimas dos columnas de la **Tabla 3- 3** presentan la incertidumbre asociada a la estabilidad del material para los dos tratamientos 1 y 2. En esta tabla se permite evidenciar que el empleo de aditivos disminuyó considerablemente la incertidumbre de la gran mayoría de los analitos, siendo más evidente este efecto para los compuestos mencionados previamente. Sumado a lo anterior, se encuentra que compuestos como clorpirifos, dimetoato y malation, aunque siguen teniendo un ajuste al modelo cinético significativo, se aprecia una mejora evidente en la incertidumbre, lo cual indica que se reduce la velocidad de la reacción, hecho que se discutirá posteriormente.

En general, se encontró que 18 de los 22 compuestos evaluados en el presente estudio, tuvieron una reducción en la incertidumbre asociada a la estabilidad del material, lo cual evidencia el efecto benéfico del uso de aditivos en la estabilización de materiales de referencia. Por otro lado, se encuentra que algunos compuestos tuvieron un leve incremento en la incertidumbre asociada a la estabilidad, lo cual se atribuye a efectos del modelo de cálculo para su estimación, el cual es fuertemente dependiente de la regresión.

Finalmente, como se mencionó previamente, el empleo de los aditivos tuvo dos objetivos, el primero se asocia al uso del metabisulfito de sodio, el cual tiene como función evitar el crecimiento microbiano y por consiguiente una mayor conservación de la matriz, debido a que ésta es el principal sustrato para estos. Por otro lado, el segundo aditivo ( acido ascórbico), tiene como función evitar la oxidación de los compuestos, la cual es la reacción que posiblemente más ocurre en estado sólido para este tipo de compuestos. Por lo anterior, se puede indicar que de acuerdo a los resultados obtenidos tanto en el capítulo II como los presentados en este númeral, se puede inferir que el ácido ascórbico es el principal inhibidor de las reacciones de degradación que puedan tener los plaguicidas y por consiguiente de la estabilidad del material de referencia.

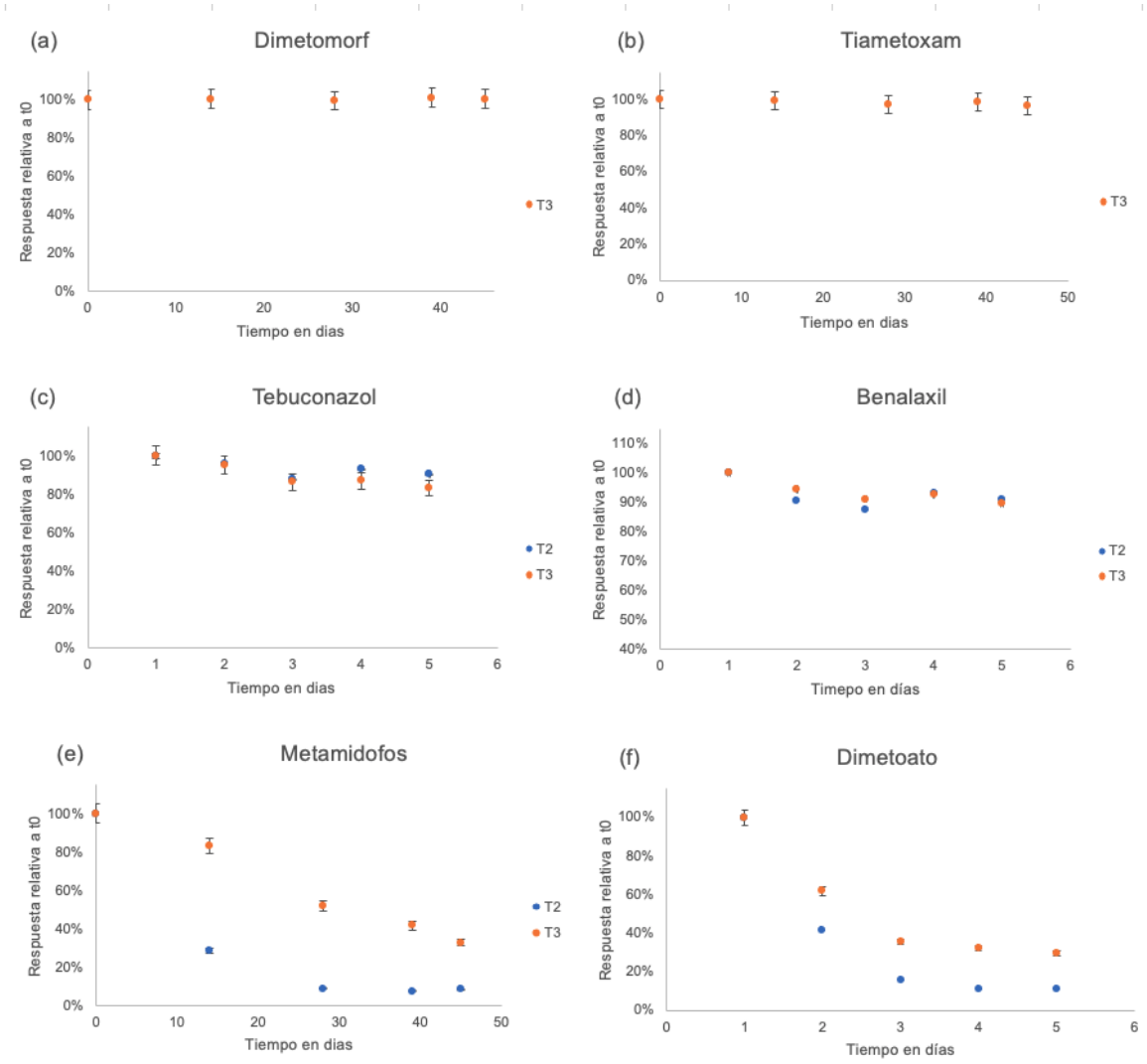
### 3.3.2 Encapsulamiento: efecto de la matriz encapsulante

Como se presentó en el capítulo 1, el proceso de encapsulación busca generar una barrera que impida la exposición del material encapsulado al medio ambiente, evitando que se generen reacciones indeseadas como por ejemplo de oxidación. En vista de lo anterior, en la presente investigación se buscó evaluar la pertinencia de esta alternativa para la estabilización de los materiales de referencia. En este contexto, y teniendo en cuenta que la pared o matriz encapsulante juega un papel importante en la estabilidad de los productos, se evaluaron dos encapsulantes ampliamente usados en la industria de los alimentos: (i) maltodextrina (T3) y (ii) maltodextrina con goma arábiga (T4).

La **Figura 3- 10** presenta las curvas de estabilidad de algunos plaguicidas seleccionados. En esta figura, se encuentra que el uso de encapsulados no afectó de manera negativa la estabilidad de los compuestos que ya se habían identificado como estables, (ver figuras a y b). Adicionalmente, en esta figura se presenta un comparativo con el T2

(aditivos+liofilización), a partir del cual se evidencia el comportamiento de algunos compuestos al ser encapsulados.

**Figura 3- 10:** Estabilidad de plaguicidas seleccionados al aplicar los tratamientos T2 y T3




En la Figura anterior, se observa que compuestos altamente inestables como metamidofos y dimetoato (ver figuras e y f), tienen un descenso en su concentración bastante significativo, pues en los 45 días del estudio se degradan hasta en un 90% incluso con la aplicación de aditivos (T2), sin embargo, con la aplicación del encapsulante (T3), se puede evidenciar una disminución en su descomposición, indicando una mejora significativa de su estabilidad. Lo anterior, puede atribuirse a que posiblemente, el uso de esta barrera protectora aísla con mayor eficiencia a los analitos del oxígeno.

La **Tabla 3- 4** presenta los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad, empleando el modelo cinético que se había determinado previamente (ver **Tabla 3- 3**). En esta tabla se encuentra que respecto a los resultados del T2 (ver **Tabla 3- 3**), se tienen coeficientes de determinación muy similares, lo cual indica que a pesar de tener una disminución en los procesos de descomposición, que se reflejan en el aumento de la respuesta, éstos siguen presentando procesos de descomposición; sin embargo, se encontró que el empleo la encapsulación permite obtener incertidumbres más bajas respecto a las obtenidas con T2 para compuestos spirodiclofen, spiromesifen, dimetoato y metamidofos, así mismo para compuestos como trifloxistrobina, dimetomorf y acetamiprid, las incertidumbres obtenidas son tan bajas que llegan a ser prácticamente cero. Lo anterior indica, que el uso de esta alternativa efectivamente brinda una protección adicional a los plaguicidas estudiados.

**Tabla 3- 4:** Resultados obtenidos en la evaluación de la incertidumbre asociada a la estabilidad. Tratamientos 3 y 4

| Compuesto | Coeficiente de determinación ($R^2$) | | $u_{est}$(%) (t= 8 d) | |
|---|---|---|---|---|
| | T3 | T4 | T3 | T4 |
| Abamectina | 0,0001* | 0,0734* | 1,07% | 1,93% |
| Acetamiprid | 0,0001* | 0,4603* | 0,42% | 0,17% |
| Alaclor | 0,6773 | 0,6152 | 0,95% | 1,93% |
| Azoxistrobina | 0,0461* | 0,0134* | 0,22% | 0,72% |
| Benalaxil | 0,6753 | 0,7373 | 1,42% | 1,23% |
| Clorpirifos | 0,7735 | 0,3889* | 2,25% | 1,92% |
| Difenoconazol | 0,0785 | 0,5178 | 0,48% | 1,15% |
| Dimetoato | 0,9306 | 0,8944 | 20,3% | 28,7% |
| Dimetomorf | 0,0002* | 0,0003* | 0,18% | 0,08% |
| Flutriafol | 0,4595* | 0,2983* | 0,22% | 0,47% |
| Malation | 0,7553 | 0,7573 | 1,12% | 4,85% |
| Metamidofos | 0,9946 | 0,9730 | 22,4% | 17,1% |
| Monocrotofos | 0,6528 | 0,6390 | 16,8% | 16,2% |
| Propamocarb | 0,2952* | 0,0802* | 9,30% | 9,10% |
| Spirodiclofen | 0,2271* | 0,0442* | 1,93% | 0,67% |
| Spiromesifen | 0,8051 | 0,6871 | 0,77% | 1,00% |
| Spinaosina-A | 0,8526 | 0,6605 | 2,27% | 2,49% |
| Spinaosina-D | 0,9538 | 0,9221 | 3,53% | 3,97% |
| Tebucanozol | 0,9098 | 0,0504* | 1,65% | 0,46% |
| Tiacloprid | 0,8243 | 0,5091 | 1,48% | 1,64% |

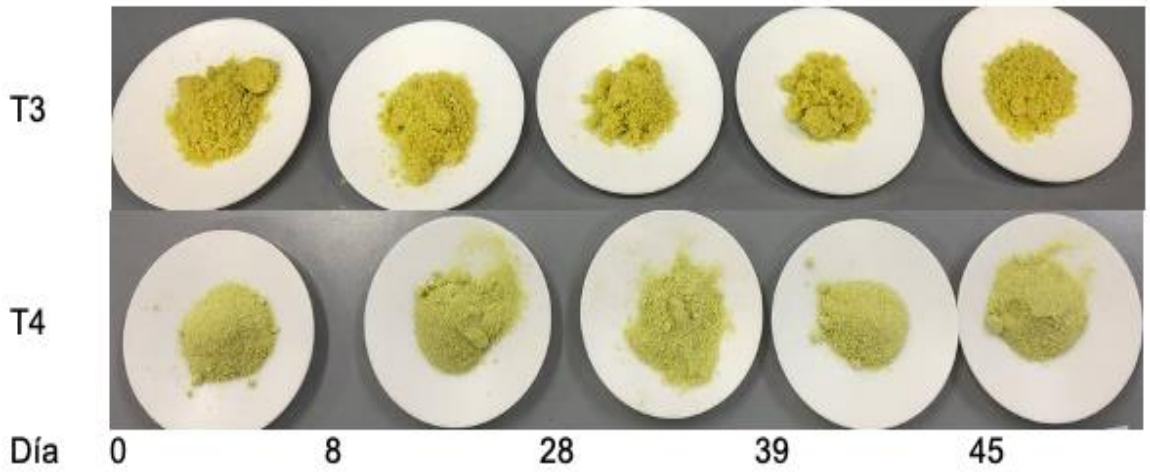
**Tabla 3-4:** (Continuación)

| Compuesto | Coeficiente de determinación ($R^2$) | | $u_{est}$(%) (t= 8 d) | |
|---|---|---|---|---|
| | T3 | T4 | T3 | T4 |
| Tiametoxam | 0,4565* | 0,2483* | 0,24% | 0,36% |
| Trifloxistrobina | 0,9753 | 0,0116* | 0,58% | 0,09% |

*No hay regresión significativa (p>0,05)

Por otro lado, la **Figura 3- 11** muestra el comportamiento durante los estudios de estabilidad para los materiales obtenidos con T3 y T4; en esta figura se observa que estos materiales mantuvieron la estabilidad de la matriz evitando la oxidación u oscurecimiento de la misma. Lo anterior indica, que al igual que se observó con el T2 ( ver **Figura 3- 8**) el material de referencia sigue manteniendo su apariencia visual luego de 45 días de estudio.

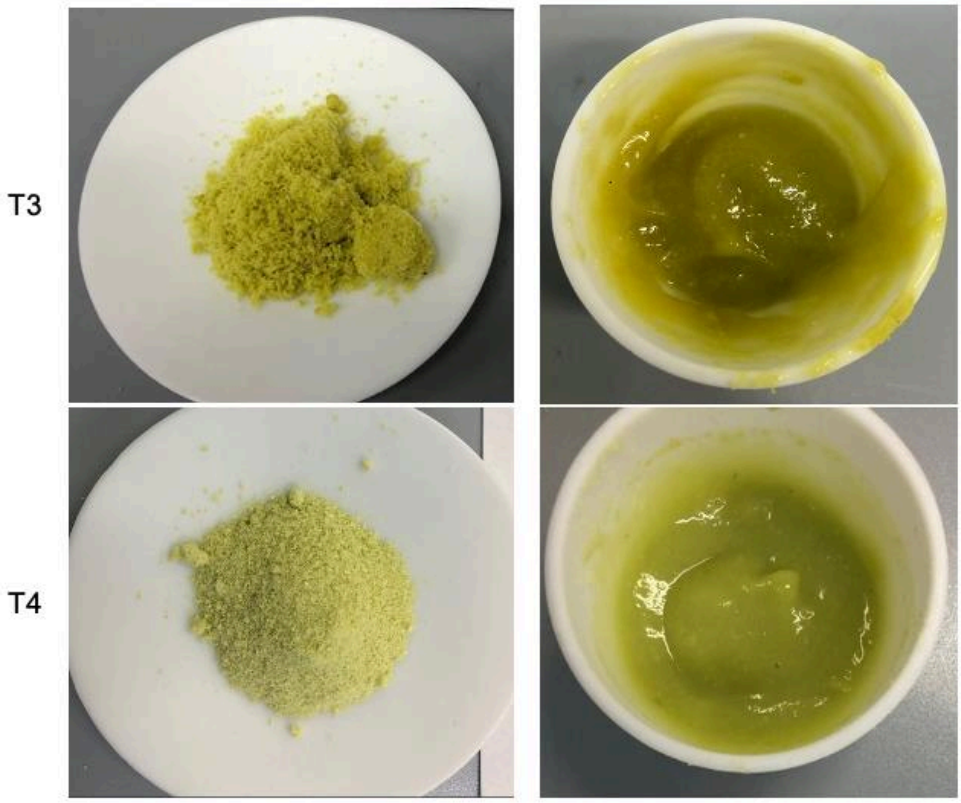
**Figura 3- 11**: Registro fotográfico del estudio de estabilidad para T3 y T4




Es importante recordar los tratamientos T3 y T4, también contienen ácido ascórbico, por lo cual al comparar la **Figura 3- 8** y **Figura 3- 11**, se podría indicar en primera instancia que el empleo de este aditivo es la principal causa de esta estabilidad visual que se permite apreciar en las fotografías. Sin embargo, es de resaltar que la tecnología de encapsulación es conocida por no sólo proteger la matriz del oxígeno, sino que adicionalmente reduce las pérdidas por volatilidad, reduce la higroscopicidad del material, siendo este último aspecto determinante para la estabilidad de un material de referencia [108].

La **Figura 3- 12** presenta los materiales obtenidos a partir de la aplicación de los tratamientos T3 y T4, adicionalmente esta figura muestra el aspecto del material una vez se realiza la reconstitución.

**Figura 3- 12:** Materiales obtenidos al aplicar los tratamientos T3 (maltodextrina) y T4 (maltodextrina+goma).




En la **Figura 3- 12** se aprecia el material obtenido a través del tratamiento T3 , en el cual se obtuvo un sólido de apariencia húmeda, aunque su higroscopicidad disminuyó respecto a los materiales sin encapsular (T1 y T2). Algunas investigaciones han reportado que esta característica puede ser atribuida a que la maltodextrina genera un recubrimiento sobre las partículas muy rápidamente, dificultando la migración de agua durante el proceso de secado [110], lo cual se contrarresta con la adición de goma arábiga (T4), la cual actúa como emulsificante y estabilizante, incrementando el efecto protector sobre el proceso de encapsulación [112], [113] .

En el caso del material obtenido a través de T3, se encontró que el proceso de reconstitución resulto ser más complejo, pues al entrar en contacto con el agua, el material

se aglomeraba y resultaba difícil lograr una adecuada reconstitución de la pulpa de aguacate; de igual manera, el material final obtenido presentaba pequeñas aglomeraciones que evidenciaban una mayor heterogeneidad, así como una fluidez, textura y color con características muy diferentes respecto a la pulpa de aguacate fresca. Por otro lado, para el caso del material obtenido a través de T4, se observó que éste era fluido, seco y sin aglomeraciones, además se solubilizó fácilmente y permitió obtener reconstituido muy similar a pulpa fresca. Es de resaltar que en ambos casos se presentó una coloración ligeramente más pálida (respecto a T1 y T2) atribuida a la adición de la matriz encapsulante, para el caso del T3 la coloración fue un poco más amarilla, mientras que para el caso del T4, se obtuvo una matriz de coloración verdosa.

Finalmente, es importante considerar que los materiales de referencia deben ser lo más similares a las muestras de rutina del laboratorio, por lo cual la aplicación de tratamientos que conduzcan a la obtención de materiales que difieran en gran medida de las muestras reales, por ejemplo el material reconstituido para el T3, resultan poco prácticas en la producción de materiales de referencia. Por lo anterior, a pesar de que los resultados que se presentan en la **Tabla 3- 4** y en la **Figura 3- 11** indican que el tratamiento 3 es una excelente alternativa para la estabilización de los materiales de referencia, en la práctica, las dificultades en el proceso de reconstitución y las diferencias en sus propiedades pueden convertirse en posibles fuentes de error, lo cual hace que sea una alternativa poco viable para la producción de materiales de referencia, por lo menos para aguacate y bajo las condiciones evaluadas en este estudio.

### 3.3.3 Encapsulamiento: efecto del proceso de secado

Dentro de los procesos de encapsulación se encuentran diferentes técnicas, siendo las más empleadas la liofilización y el secado por aspersión. La liofilización es una técnica basada en un proceso de deshidratación por sublimación, por lo que las sustancias no están expuestas a altas temperaturas y los productos obtenidos conservan mejor muchas de sus propiedades. Por otro lado, el secado por aspersión se basa en la conversión de un producto en estado fluido a polvo, a través de un procesamiento continuo en un medio caliente. Esta técnica tiene como ventaja que permite obtener un tamaño de partícula uniforme y una rápida eliminación de agua, por lo que es ampliamente empleada, incluso

en algunos productos térmicamente sensibles [114]. En ambos casos se ha reportado que la aplicación de estos tratamientos en general, permite mejorar la vida útil de los productos y obtener productos instantáneamente similares a los originales, una vez reconstituidos.

Teniendo en cuenta lo anterior, se aplicó el tratamiento T5, con el fin de evidenciar el efecto del secado por aspersión en las características del material de referencia. La **Figura 3- 13** muestra el material obtenido al aplicar este tratamiento.

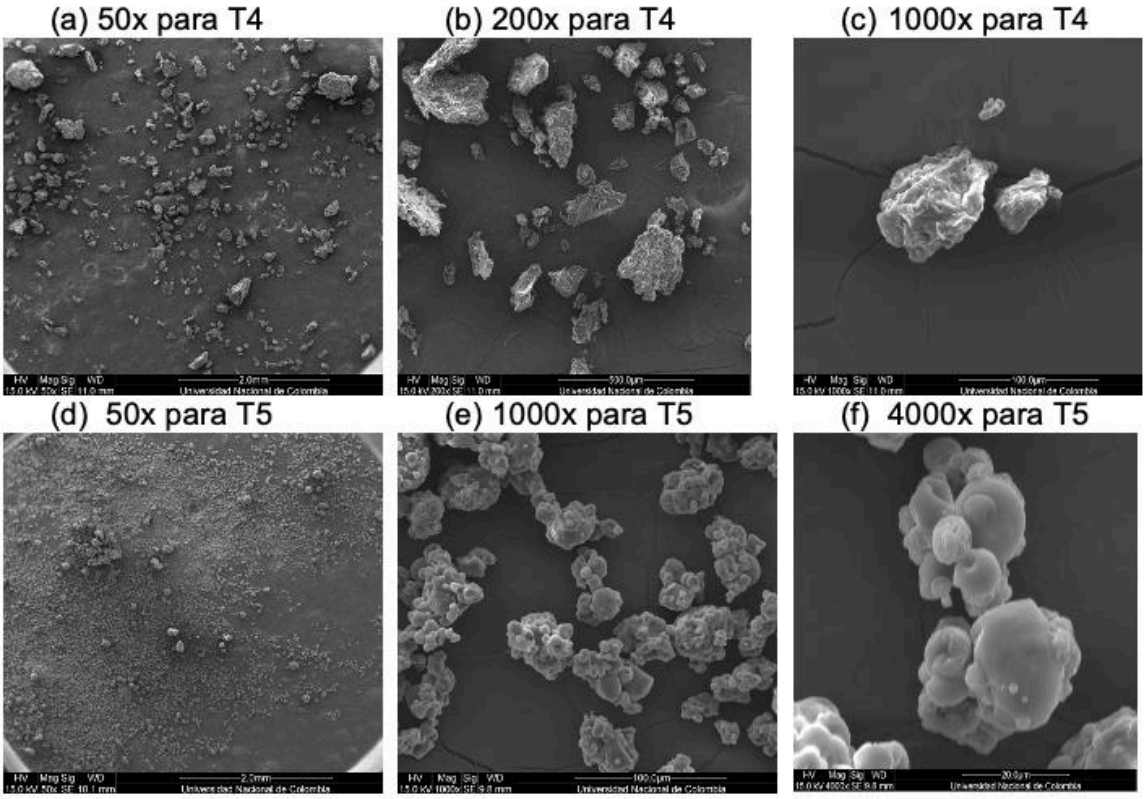
**Figura 3- 13:** Material obtenido a partir del T5

El material obtenido al aplicar el tratamiento T5 correspondió a un polvo más fino que el obtenido en tratamientos presentados previamente, lo que conducía a que se tuviera una mayor aglomeración, la cual se puede apreciar en **Figura 3- 13**. Sin embargo, el material no presentó higroscopicidad y se observaba menos oleoso que los obtenidos a través de liofilización. Según lo reportado en otras investigaciones, esto se debe principalmente a la diferencia en el mecanismo de deshidratación, lo que afecta en gran medida la microestructura y la integridad de la cápsula [115].

La cápsula obtenida por los procesos de liofilización, usualmente corresponde a una estructura porosa e irregular de mayor tamaño, lo que favorece la apertura de la estructura del polvo, liberando grasa de la partícula a la superficie. Esto puede ser corroborado en la **Figura 3- 14**, la cual muestra las imágenes de microscopia electrónica de barrido para los materiales correspondientes a T4 y T5. En esta figura se pueden evidenciar las diferencias en la morfología de los materiales, especialmente relacionadas con la porosidad y tamaño

de partícula. Acorde con las investigaciones reportadas, el secado por aspersión permite un tamaño mucho mas fino y presenta partículas de mayor homogeneidad.

**Figura 3- 14**: Imágenes de microscopia electrónica de barrido de los materiales T4 y T5




Por otro lado, para este material se observó una coloración pálida (**Figura 3- 13**) respecto a los demás materiales obtenidos, la cual se mantuvo durante todo estudio de estabilidad; este efecto de color puede ser atribuido a la dinámica del proceso de secado por aspersión, pues de acuerdo a lo reportado en literatura, la temperatura, presión y, tamaño de las partículas pueden interferir sobre las características del producto final [116].

De otra parte, de manera similar al material obtenido mediante T3, en el proceso de reconstitución se dificultó romper por completo los grumos que se formaban al entrar en contacto con el agua, sin embargo, una vez se logró la homogenización, se obtuvo un producto reconstituido de color similar a la pulpa fresca.

La **Tabla 3- 5** muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la incertidumbre asociada a la estabilidad de los plaguicidas al emplear el proceso de secado por aspersión (T5).

**Tabla 3- 5:** Resultados obtenidos de la evaluación de la incertidumbre asociada a la estabilidad. Tratamiento (T5)

| *Compuesto* | *Coeficiente de determinación* $R^2$ | $u_{est}$*(%)* |
|---|---|---|
| Abamectina* | 0,0002* | 2,19% |
| Acetamiprid* | 0,1004* | 0,16% |
| Alaclor | 0,8639 | 1,70% |
| Azoxistrobina* | 0,9104 | 0,58% |
| Benalaxil | 0,9983 | 2,11% |
| Clorpirifos | 0,7749 | 0,77% |
| Difenoconazol* | 0,5203 | 1,15% |
| Dimetoato | 0,9908 | 9,54% |
| Dimetomorf* | 0,0002* | 0,13% |
| Flutriafol* | 0,0062* | 0,26% |
| Malation | 0,9151 | 1,19% |
| Metamidofos | 0,9972 | 4,41% |
| Monocrotofos | 0,9406 | 12,75% |
| Propamocarb* | 0,0001* | 0,27% |
| Spirodiclofen* | 0,9285 | 2,00% |
| Spiromesifen | 0,8870 | 1,34% |
| Spinaosina-A | 0,9925 | 3,19% |
| Spinaosina-D | 0,9427 | 2,86% |
| Tebucanozol | 0,8923 | 1,97% |
| Tiacloprid | 0,8102 | 0,33% |
| Tiametoxam | 0,5313 | 0,31% |
| Trifloxistrobina | 0,3861* | 1,18% |

*No hay regresión significativa (p>0,05)

Los resultados evidenciaron que 15 de los compuestos evaluados mantuvieron incertidumbres similares a las obtenidas con el secado por liofilización (T4), presentando en todos los casos incertidumbres inferiores a 4,85%, por lo que se puede concluir que, en general, el proceso de secado no interfiere en la estabilidad de los analitos.

Durante la aplicación del secado por aspersión, para algunos compuestos como tebuconazol y trifloxistrobina, se tuvo un leve incremento en las incertidumbres de estabilidad, sin embargo, este incremento no resulta ser significativo, considerando que sus incertidumbres son inferiores al 2%, lo cual es relativamente bajo teniendo en cuenta que son materiales de referencia para mediciones que permiten incertidumbres de hasta el 50%, es decir, materiales de referencia con incertidumbres de hasta el 10% serían adecuados para esta medición.

En la **Tabla 3- 5** se puede observar que compuestos como dimetoato, monocrotofos y metamidofos presentan las incertidumbres más bajas de todos los tratamientos (ver **Tabla 3- 4** y **Tabla 3- 5**); en especial, para el caso de metamidofos se encuentra una mejora en la incertidumbre de casi cinco veces. Lo anterior, indica que el material de referencia obtenido a través de secado por aspersión, posiblemente evita de manera más eficaz las reacciones de oxidación de los plaguicidas, lo cual se atribuye a que sus características morfológicas: mejor tamaño de partícula y mayor homogeneidad (ver **Figura 3- 14**).

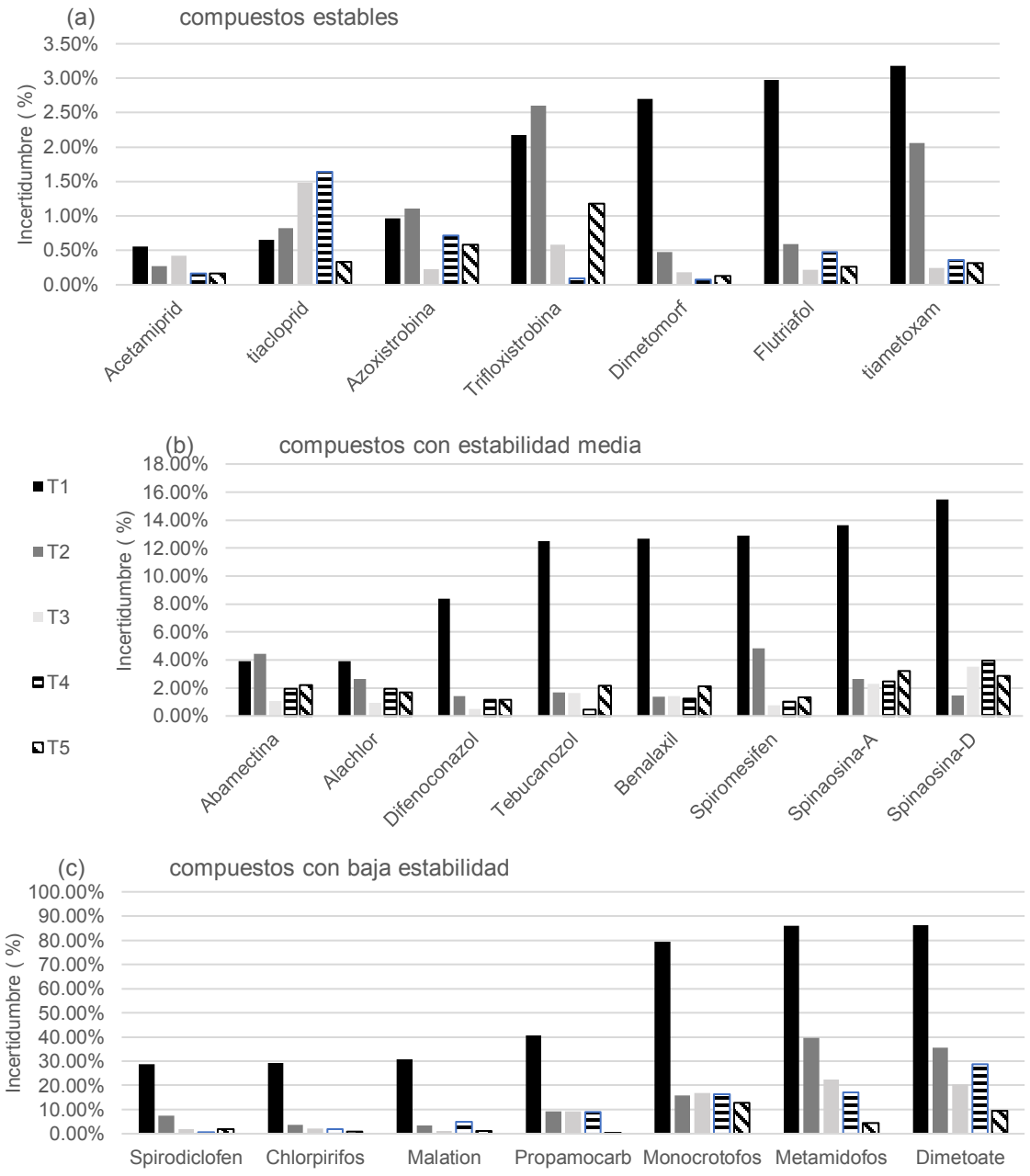
Finalmente, la

**Figura 3- 15**, presenta un resumen de las incertidumbres obtenidas que buscan realizar una comparación de los diferentes tratamientos. En la

**Figura 3- 15**, se puede apreciar que, con la aplicación de aditivos o procesos de encapsulamiento la incertidumbre siempre mejoró respecto a la aplicación de sólo el proceso de liofilización. En la

**Figura 3- 15** se encuentra que para algunos compuestos como trifloxistrobina, tiametoxan y abamectina, se presentaron aumentos en la incertidumbre al emplear el tratamiento 2, sin embargo, es de resaltar que en estos aumentos son relativamente despreciables. por ejemplo trifloxistrobina aumentó de 2,18 % a 2,60% empleando aditivos.

**Figura 3- 15:** Comparación de las incertidumbres obtenidas para los diferentes tratamientos.




Igualmente, la

**Figura 3- 15** muestra que existe una distribución más homogénea de la frecuencia en la que se obtiene una incertidumbre más baja con el empleo de los diferentes tratamientos (T2 a T5) y que en la mayoría de las veces la incertidumbre más alta se obtiene con el T1, es decir sólo con la liofilización. Es de resaltar que para ninguno de los casos se obtuvo la menor incertidumbre empleando el tratamiento 1 (sólo liofilización), lo que confirma que con cualquiera de las alternativas propuestas siempre se obtuvieron mejores incertidumbres.

De igual manera, se encuentra que, en general, la incertidumbre obtenida a través de la aplicación del tratamiento T3 es la mejor, seguida por el tratamiento T5; sin embargo, como se comentó en las secciones anteriores estos son los tratamientos que precisamente generaron inconvenientes en la reconstitución, lo cual no permite su aplicación en la producción normalizada de materiales de referencia, por lo anterior y teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la evaluación de la estabilidad así como las características del material, el tratamiento 4, resulta adecuado como estrategia para la producción de materiales de referencia.

## 3.4 Conclusiones

Se realizó la producción de cinco materiales de referencia sobre los cuales se evaluaron diferentes tratamientos para determinar su influencia sobre la estabilidad de los analitos. Los resultados evidenciaron que el uso de aditivos como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, tienen una influencia positiva sobre vida útil de la matriz y la estabilidad de los analitos respecto al material sin ningún tipo de aditivos. Por otro lado, se evidenció que el uso de encapsulados empleando la mezcla de maltodextrina y goma arábiga, permite no solo obtener un material de fácil reconstitución y con características similares a una pulpa fresca, sino también incrementar la estabilidad de los analitos evitando su degradación por reacciones adversas con el ambiente.

Finalmente, se evidenció que los dos procesos de secado evaluados son adecuados para la producción de materiales de referencia y presentan resultados similares para todos los

compuestos evaluados, a excepción de dimetoato, metamidofos y malation, compuestos que presentaron mejoras en su incertidumbre de hasta 5 veces al emplearse secado por aspersión; sin embargo, el proceso de reconstitución para el material obtenido por secado por aspersión, presento algunos inconvenientes que impiden que se considere como un candidato idóneo para material de referencia.

Esta investigación, presenta información relevante que puede ser empleada dentro de los procesos de producción de nuevos materiales de referencia de plaguicidas en matriz, permitiendo proporcionar nuevos materiales que signifiquen un recurso importante para la comunidad científica involucrada en el análisis de residuos de plaguicidas en muestras de alimentos.

# 4. Conclusiones generales y recomendaciones

## 4.1. Conclusiones generales

En el capitulo I de esta tesis, se justificó la necesidad de evaluar diferentes métodos que permitan incrementar la estabilidad de plaguicidas, con el fin de viabilizar la producción de materiales de referencia, aumentar su vida útil y/o disminuir las incertidumbres debidas a la estabilidad. Para lograr este objetivo, en el capitulo II se desarrollaron y validaron cuatro metodologías analíticas a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, las cuales demostraron ser adecuadas para realizar la evaluación de la homogeneidad y la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas en soluciones de calibración. Mediante los estudios de estabilidad realizados a cuatro candidatos a MR, se logró evidenciar la inestabilidad de ocho de los 14 compuestos evaluados, los cuales

mostraron ser susceptibles a procesos de degradación principalmente, por oxidación e hidrolisis. La aplicación de los aditivos propuestos en este estudio demostraron ser alternativas efectivas para incrementar la estabilidad de plaguicidas, permitiendo estabilizar el 100% de los compuestos inestables, lo anterior no solo se vio reflejado en la inexistencia de cambios en la concentración de los analitos durante todo el estudio, si no también en la disminución de las incertidumbres asociadas a la inestabilidad, logrando incertidumbres hasta 286 veces menores al aplicar los aditivos. Estos resultados, representan un aporte importante que podrá ser aplicado en futuras producciones de materiales de referencia de este tipo en el país.

En el capitulo III se estudió el efecto del uso de aditivos y encapsulados sobre la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate hass. Encontrándose que el uso de aditivos como antioxidantes y conservantes, brinda un incremento en la vida útil de la matriz y la estabilidad de los analitos. Por otro lado, se logró establecer que el uso de la mezcla maltodextrina y goma arábiga como matriz encapsulante acompañada de los aditivos y secado por liofilización, permite obtener un material encapsulado de fácil reconstitución, de matriz estable y apariencia similar a una muestra real, además a partir del uso de esta alternativa se lograron obtener incertidumbres adecuadas para el propósito para todos los componentes de los MR. Esta investigación logra establecer una línea base para la producción de materiales de referencia de plaguicidas en matriz.

Por otro lado, se evidenciaron las aplicaciones de los resultados obtenidos durante esta investigación en la producción de un material de referencia empleado como ítem en el ensayo de aptitud 20-INM-EA-05 ofertado por el INM, en el cual ocho laboratorios nacionales demostraron sus capacidades de medición de residuos de plaguicidas en alimentos de manera satisfactoria. Igualmente, este material se ofertó como material de referencia no certificado, el cual puede ser empleado como control de calidad o en el desarrollo y validación de metodologías analíticas por los laboratorios del país. Finalmente, se destacaron los productos de I+D+i obtenidos a partir de esta investigación.

## 4.2. Recomendaciones

Como aspectos a considerar en el desarrollo de futuras investigaciones se recomienda: (i) evaluar el uso de otras matrices encapsulantes, (ii) evaluar la aplicabilidad de los tratamientos sobre otras matrices de interés y, (iii) realizar estudios de estabilidad empleando puntos mas seguidos en el tiempo, con el fin de proporcionar mejores ajustes en la evaluación de las cinéticas de reacción.

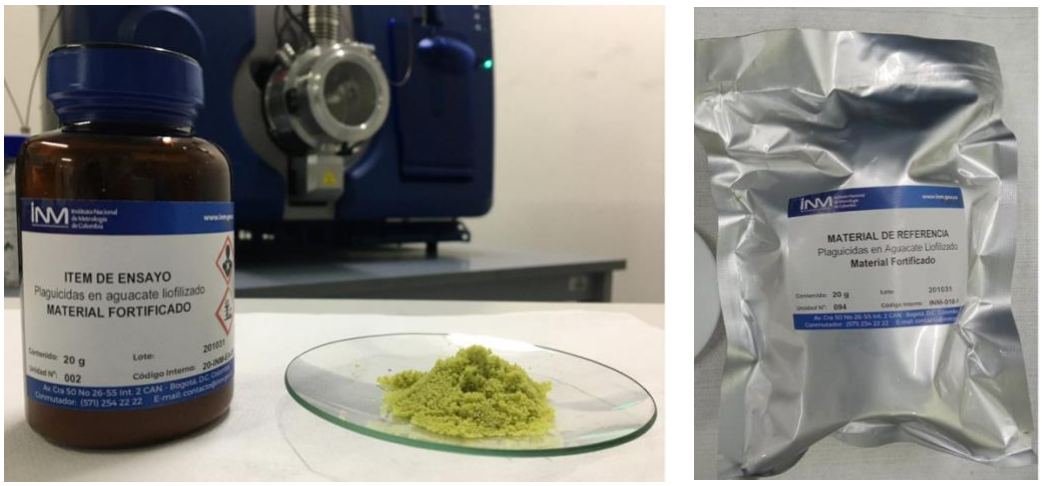
# 5. Aplicaciones y productos

La presente sección, tiene como propósito relacionar las aplicaciones y diferentes productos de desarrollo tecnológico obtenidos a partir de esta investigación. Para ello, inicialmente se presentan los materiales de referencia generados por el Instituto Nacional de Metrología de Colombia, los cuales fueron producidos con la aplicación de las estrategias de estabilización estudiadas en el capitulo 3, estos materiales corresponden a un MR de plaguicidas en matriz de aguacate, que fue empleado como (i) ítem en un ensayo de aptitud y fue ofertado por el INM como (ii) material de referencia no certificado, el cual puede ser usado como control de calidad en mediciones de residuos de plaguicidas en alimentos. Finalmente, se relacionan la participación en eventos científicos y la publicación de un articulo corto generado a partir de los resultados del capitulo 2.

## 5.1. Producción del material de referencia de residuos de plaguicidas en aguacate hass *(Persea americana)*

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación, se lograron establecer las condiciones adecuadas para la producción de un nuevo material de referencia de plaguicidas en aguacate *hass*, el cual fue empleado en el desarrollo del ensayo de aptitud 20-INM-EA-05. Para la producción del material se implementaron las estrategias de estabilización correspondientes al tratamiento T4, explicado en el capitulo 3. Se produjeron 100 unidades del material de referencia y otras 80 unidades, con el mismo tratamiento aplicado a un blanco de matriz. La **Figura 5- 1** muestra el material obtenido.

**Figura 5- 1:** Material de referencia ofertado por el INM como ítem de ensayo




### 5.1.1. Evaluación de la homogeneidad y estabilidad del material de referencia

Una vez obtenido el MR, se realizó la evaluación de la homogeneidad y, con el fin de asegurar la estabilidad del material durante el ensayo de aptitud, se realizó un seguimiento con una duración de 3 meses. En ambos casos, las determinaciones analíticas se realizaron a través de HPLC-MS/MS, acorde a la metodología experimental descrita en la sección 3.2.6.

Para la evaluación de la homogeneidad se emplearon 10 unidades seleccionadas sistemáticamente, la medición se realizó empleando un diseño experimental en bloques

completamente aleatorizados, y el análisis de resultados se realizó a través de un análisis de varianza ANOVA de dos vías. Mientras que para el caso de la estabilidad se realizó la selección de 12 unidades de manera aleatoria, el estudio se llevo a cabo a través de un diseño isócrono exponiendo las unidades a condiciones de almacenamiento (4 ºC) y empleando -80 ºC como temperatura de referencia.

La estimación de las incertidumbres debidas a la homogeniedad ($u_{hom}$) y estabilidad ($u_{est}$) del material, se llevo a cabo acorde a las recomendaciones de la guía ISO35 [8]. La **Tabla 5- 1**, consolida los resultados de las incertidumbres obtenidas por estas componentes.

**Tabla 5- 1:** Incertidumbre debida a la homogeneidad y estabilidad del MR

| Compuesto | $u_{hom}$ | $u_{est}$ |
|---|---|---|
| DDE | 3,19% | 2,07% |
| Endosulfán | 1,55% | 2,07% |
| Azoxistrobina | 1,21% | 1,10% |
| Fipronil | 3,19% | 2,07% |
| Malation | 0,57% | 1,65% |
| Tebuconazol | 0,98% | 0,00% |
| Tiametoxam | 3,19% | 0,00% |
| Clorpirifos | 0,36% | 0,00% |
| Dimetoato | 0,25% | 2,07% |
| Metamidofos | 0,50% | 1,21% |
| Difenoconazol | 1,08% | 0,00% |

Los resultados mostraron que para todos los analitos, el material mostró ser suficientemente homogéneo y estable durante el tiempo del ensayo de aptitud, siendo almacenado a temperaturas de máximo 4 ºC y transportado hasta por una semana a temperatura ambiente.

### 5.1.2. Medición de la propiedad y asignación del valor

El valor de la propiedad fue medido a través de un estudio colaborativo en el que participaron el laboratorio de referencia de la Unión Europea para residuos de plaguicidas en frutas y vegetales (EURL-FV), el laboratorio de residuos de plaguicidas de la agencia austriaca para la salud y seguridad alimentaria (AGES) y, el Instituto Nacional de Metrología de Colombia.

La combinación de los valores se realizó a través del método propuesto por Levenson [117] y DerSimonian Laird[118]. La **Tabla 5- 2** consolida los resultados obtenidos para cada analito.

**Tabla 5- 2:** Valores de referencia para cada analito y sus respectivas incertidumbres

| *Analito* | *Incertidumbre relativa combinada $u_c$ (%)* | *Valor de referencia (mg/kg)* | *Incertidumbre del valor de referencia (mg/kg)* |
|---|---|---|---|
| DDE | 4,060% | 0,138 | 0,0056 |
| Endosulfán | 3,426% | 0,146 | 0,0050 |
| Azoxistrobina | 6,174% | 0,036 | 0,0022 |
| Fipronil | 5,341% | 0,028 | 0,0015 |
| Malation | 3,260% | 0,055 | 0,0018 |
| Tebuconazol | 2,217% | 0,083 | 0,0019 |
| Tiametoxam | 3,899% | 0,356 | 0,0139 |
| Clorpirifos | 2,754% | 0,104 | 0,0029 |
| Dimetoato | 2,865% | 0,026 | 0,0007 |
| Metamidofos | 6,698% | 0,027 | 0,0018 |
| Difenoconazol | 4,221% | 0,324 | 0,0137 |

## 5.2. Productos

### 5.2.1. Productos de desarrollo tecnológico

Como se mencionó en la sección anterior se aplicaron los resultados de la investigación en la producción del Material de Referencia empleado como ítem de ensayo en el ensayo de aptitud 20-INM-EA-05, en el cual participaron ocho laboratorios de ensayo a nivel nacional. El desarrollo de este ensayo de aptitud permitió brindar una herramienta para que los laboratorios evaluaran su desempeño en la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos. Este MR, ha sido también ofertado como material de referencia no certificado por el Instituto Nacional de Metrología y puede ser empleado como control de calidad dentro de los procesos de medicación de los laboratorios.

### 5.2.2. Productos de apropiación social del conocimiento

Los resultados obtenidos durante esta investigación han sido presentados en los siguientes eventos:

- **17th IMEKO TC 10 and EUROLAB Virtual Conference 2020: Global Trends in Testing, Diagnostics & Inspection for 2030. Organizado por la Confederación Internacional de Mediciones (IMEKO)**. En el cual se participó bajo modalidad oral con el trabajo titulado "Stabilization strategies for unstable pesticides in calibration reference materials".

- **2nd Analytical and bioanalytical methods conference:Analyticon 2020**, llevado a cabo de manera virtual del 27 al 29 de abril de 2020 desde San Francisco (Estados Unidos). En el cual se participó en modalidad poster con el trabajo titulado: "Homogeneity study of cadidate reference material of pesticides residues in avocado *(persea americana)".*

- **8th Latin American Pesticide Residue Workshop (LAPRW)**, llevado a cabo de manera virtual entre el 18 y 21 de mayo de 2021, en el cual se participó en modalidad de poster con el trabajo titulado "Homogeneity and short-term stability assessment of a referecne material of pesticide residues in freeze-dried avocado (*Persea americana*) using QuEChERS based method and LC-MS/MS"

- **34º Congreso Latinoamericano de química CLAQ,** llevado a cabo en Cartagena entre el 11 y 18 de octubre de 2021 con los trabajos titulados: "Evaluación del efecto de uso de encapsulados sobre la estabilidad de materiales de referencia de plaguicidas en aguacate" modalidad oral-poster y "Development and certification of reference material of pesticides residues in avocado", en modalidad oral.

### 5.2.3. Productos de nuevo conocimiento

- *Artículo corto:*

L. V. Morales, E., D. C. Sinuco, and D. A. Ahumada, "Stabilization strategies for unstable pesticides in calibration reference materials," *17th IMEKO TC 10 EUROLAB Virtual Conf. "Global Trends Testing, Diagnostics Insp. 2030,"* pp. 129–134, 2020. Disponible en: https://www.imeko.org/publications/tc10-2020/IMEKO-TC10-2020-015.pdf

- *Artículo sometido en Journal of AOAC International*

Laura V. Morales, Andrés S. Salinas, Ivonne A. González, Katherin Holguin, Diana C. Sinuco, Francisco J. Díaz-Galiano, Diego A. Ahumada, Amadeo R. Fernández-Alba. Development of avocado reference material for pesticide residue analysis

- *Artículo sometido en Food Control*

Laura V. Morales, Andrés S. Salinas, Ivonne A. González, Diana C. Sinuco, Diego A. Ahumada. Evaluation of the encapsulates effect on reference materials stability of pesticides in avocado.

# A. Anexo: Resultados obtenidos para la evaluación de la estabilidad de PCB en soluciones de calibración

| | *Coeficiente de determinación $R^2$* | | | *$u_{est}$ (%)* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Material candidato* | *Ambiente oxidativo* | *Atmósfera inerte* | *Atmósfera inerte y ácido fórmico* | *Ambiente oxidativo* | *Atmósfera inerte* | *Atmósfera inerte y ácido fórmico* |
| MR1 | 0,056 | 0,020 | 0,056 | 0,02% | 0,02% | 0,03% |
| MR2 | 0,016 | 0,015 | 0,060 | 0,01% | 0,01% | 0,04% |
| MR3 | 0,236 | 0,056 | 0,060 | 0,02% | 0,02% | 0,03% |
| MR4 | 0,102 | 0,074 | 0,039 | 0,02% | 0,04% | 0,04% |

# B. Anexo: análisis microbiológico del aguacate liofilizado

| | | | |
|---|---|---|---|
| **LUGAR** | INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA | **TEMP.** 4°C | |
| **MUESTRA** | PLAGUICIDAS EN AGUACATE LIOFILIZADO | | |
| **MUESTREO REALIZADO POR** | CLIENTE | **LOTE** | 201031 |
| **CLASE DE EMPAQUE** | PLASTICO | **FECHA FABRICACIÓN** | 31/10/2020 |
| **FECHA VENCIMIENTO** | 30/04/2021 (Sin Reconstituir) | **FECHA TOMA MUESTRA** | 2020/12/01 |
| **PROVEEDOR** | Instituto Nacional de Metrologia | **CONDICIÓN** | SOLIDO |

**RESULTADO MICROBIOLOGICO DE ALIMENTO**

| ANÁLISIS | MÉTODO | ESPECIFICACIÓN | RESULTADO |
|---|---|---|---|
| Recuento total de Aerobios mesófilos UFC/g-mL | AOAC 966.23 ED. 21:2019 | N/A | 100 |
| * Recuento de Estafilococo coagulasa positiva UFC/g-mL | UNE EN ISO 6888-1:2000 | N/A | < 100 |
| * Detección de Salmonella en 25g | ISO 6579-1:2017 | N/A | AUSENCIA |
| * Recuento de Bacillus cereus UFC/g-mL | UNE EN ISO 7932:2005 | N/A | < 100 |
| Recuento de Mohos y Levaduras UFC/g-mL | ISO 21527-2 :2008 | N/A | < 100 |
| Recuento de Coliformes totales UFC/g-mL | ISO 4832:2006 | N/A | 30 |
| Recuento de Coliformes fecales UFC/g-mL | ISO 4832:2006 | N/A | < 10 |

*** Análisis Acreditado ISO 17025**

**ESPECIFICACION SEGUN CLIENTE**

El resultado aplica únicamente a la muestra recibida y analizada
No se permite la reproducción total o parcial de este documento sin autorización expresa del laboratorio.
¹Recipiente o envoltura en la cual se recepcionó la muestra en el laboratorio
El plan de muestreo es realizado por el cliente

**SANDRA LORENA PALOMA SOLANO**
MICROBIÓLOGA
ANALISTA MB BIOINDUSTRIAL

**NANCY LA ROTTA**
MICROBIÓLOGA
JEFE DE LABORATORIO MICROBIOLOGÍA (E)

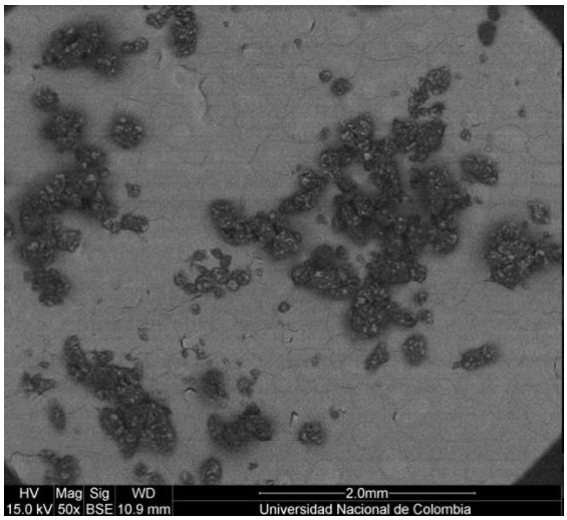
**Fecha de impresión: Miércoles, 9 de Diciembre de 2020**

**--- FIN DEL INFORME---**

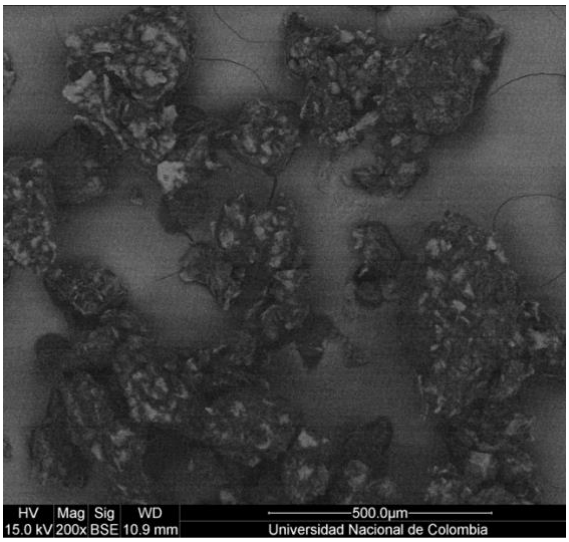
**Informe generado desde el BIOSIP**

# C. Anexo: imágenes de microscopia electrónica de barrido al material de aguacate liofilizado (T1)

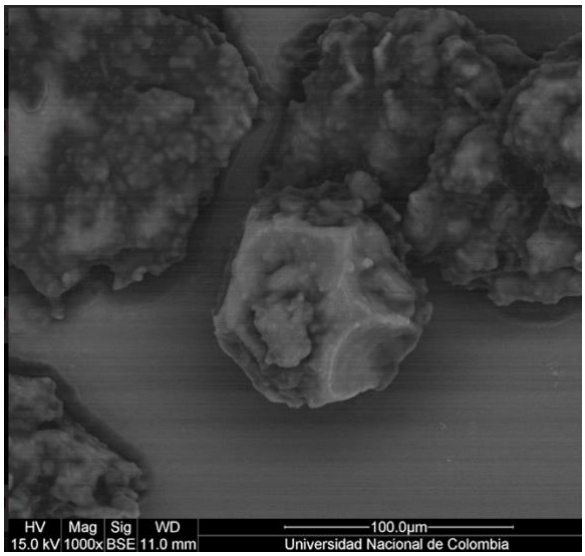
50x



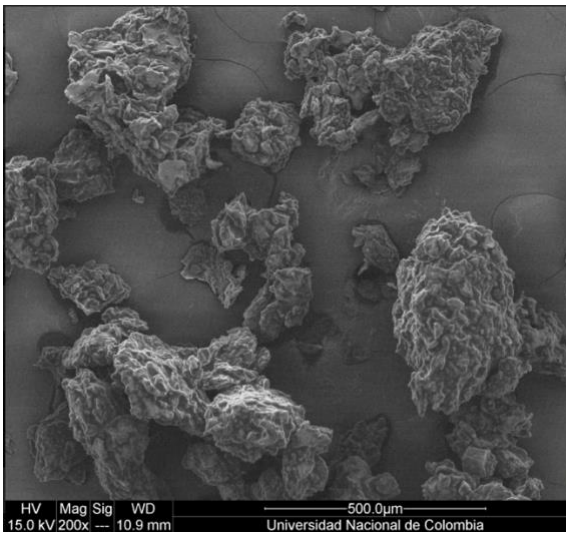

200x




1000x

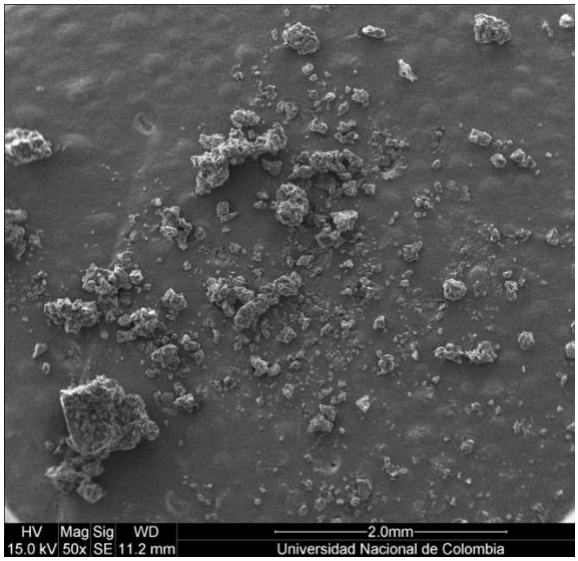



200x

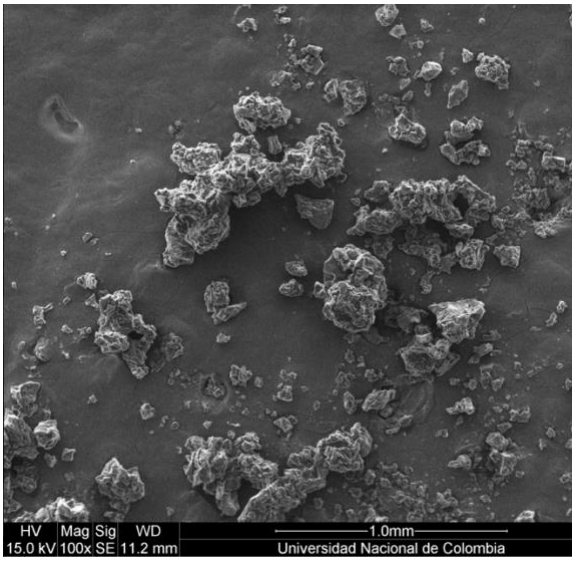


# D. Anexo: imágenes de microscopia electrónica de barrido al material liofilizado y encapsulado con maltodextrina (T3)

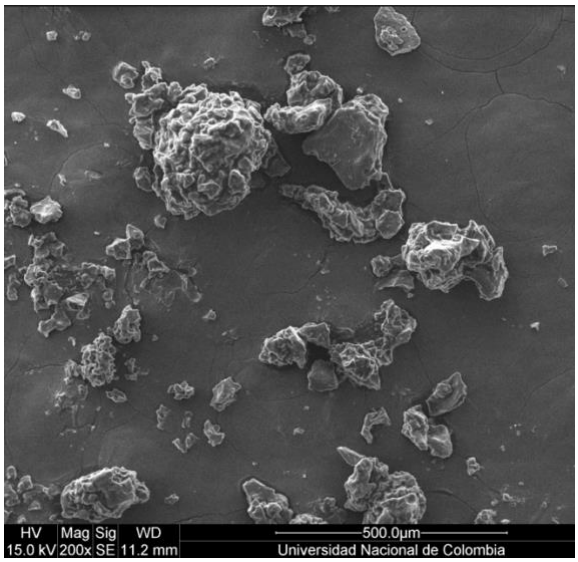
50x



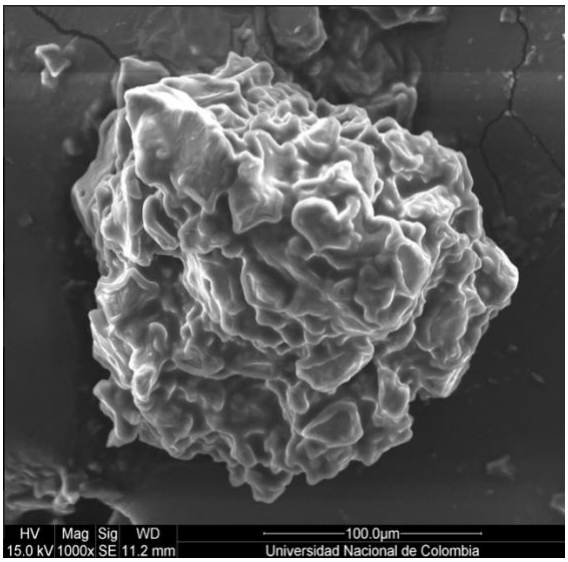

100x




200x




1000x



# Bibliografía


[1] S. A. Wise, “What is novel about certified reference materials?,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 8, pp. 2045–2049, 2018.

[2] Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), “Certified Reference Materials COMAR Database.” [Online]. Available: https://www.comar.bam.de/home/search_applic.php.

[3] International Organization for Standarization (ISO), “ISO Guide 30:2015, Reference materials — Selected terms and definitions.” Geneva, 2015.

[4] M. del R. Arvizu Torres, E. Valle Moya, and A. Reyes del Valle, “Estudios de estabilidad en materiales de referencia ertificados en matriz acuosa empleando el método de pérdidas de transpiración,” in *Simposio de Metrología*, 2010, pp. 1–9.

[5] A. Lamberty, H. Schimmel, and J. Pauwels, “The study of the stability of reference materials by isochronous measurements,” *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 360, no. 3, pp. 359–361, 1998.

[6] Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM), “COMAR, International database for Certified Reference Materials,” 2014. .

[7] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura and Organización Mundial de la Salud, *Manual de procedimiento-Comisión del CODEX Alimentarius*, 27th ed. Rome, 2019.

[8] International Organization for Standarization (ISO), “ISO GUIDE 35:2017 Reference materials — Guidance for the characterization and the assessment of the homogeneity and stability of the material.” Geneva, Switzerland, 2017.

[9] D. A. Ahumada Forigua, L. L. Soto Morales, L. V. Morales Erazo, and J. P. Abella Gamba, “Desarrollo de un material de referencia certificado para análisis elemental de agua potable,” *Rev. Colomb. Química*, vol. 48, no. 3 SE-, pp. 36–44, Sep. 2019.

[10] Joint Committee for Guides in Metrology, “JCGM 100:2008-Guide to the expression of uncertainty in measurement, GUM 1995, with minor modifications,” *InBureau*

*International des Poids et Mesures-BIPM*, vol. 50, no. September. p. 134, 2008.

[11] T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. van der Veen, H. Schimmel, and A. Lamberty, “Homogeneity and stability of reference materials,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 6, no. 1, pp. 20–25, 2001.

[12] J. W. Finley, A.-N. Kong, K. J. Hintze, E. H. Jeffery, L. L. Ji, and X. G. Lei, “Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 13, pp. 6837–6846, Jul. 2011.

[13] F. Ibañez, P. Torre, and A. Irigoyen, “Aditivos alimentarios,” Pamplona, España, 2003.

[14] R. García-García and S. S. Searle, “Preservatives: Food Use,” B. Caballero, P. M. Finglas, and F. B. T.-E. of F. and H. Toldrá, Eds. Oxford: Academic Press, 2016, pp. 505–509.

[15] C. de la U. E. Parlamento Europeo, *Reglamento (CE) n o 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 , sobre aditivos alimentarios (Texto pertinente a efectos del EEE)*. 2008.

[16] N. J. Zuidam and E. Shimoni, “Overview of microencapsulates for use in food products or process and methods to make them,” in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 1st ed., N. J. Zuidam and V. Nedovic, Eds. Springer-Verlag New York, 2010, pp. 3–4.

[17] C. Wandrey, A. Bartkowiak, and S. E. Harding, “Materials for Encapsulation BT - Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing,” N. J. Zuidam and V. Nedovic, Eds. New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 31–100.

[18] J. Castro-Rosas *et al.*, “Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review,” *Food Res. Int.*, vol. 102, no. May, pp. 575–587, 2017.

[19] B. F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli, and C. N. Mulligan, “Encapsulation in the food industry: a review.,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 50, no. 3, pp. 213–224, May 1999.

[20] Z. Fang and B. Bhandari, “Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, N. Garti and D. J. B. T.-E. T. and D. S. for F. I. and N. McClements, Eds. Woodhead Publishing, 2012, pp. 73–109.

[21] J. L. Villacrez, “Desarrollo de microencapsulados por SPRAY DRYING a partir de frutos de mora de castilla ( Rubus glaucus Benth ).,” p. 92, 2013.

[22] C. Quan, “Establishment of the purity values of carbohydrate certified reference materials using quantitative nuclear magnetic resonance and mass balance approach,” *Food Chem.*, vol. 153, pp. 378–386, 2014.

[23] T. Saito *et al.*, “A new traceability scheme for the development of international system-traceable persistent organic pollutant reference materials by quantitative nuclear magnetic resonance,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 14, no. 2, pp. 79–86, 2009.

[24] H. Wang, K. Ma, W. Zhang, J. Li, G. Sun, and H. Li, “Certification of the reference material of water content in water saturated 1-octanol by Karl Fischer coulometry, Karl Fischer volumetry and quantitative nuclear magnetic resonance,” *Food Chem.*, vol. 134, no. 4, pp. 2362–2366, 2012.

[25] K. A. Lippa, D. L. Duewer, M. A. Nelson, S. R. Davies, and L. G. Mackay, “The role of the CCQM OAWG in providing SI traceable calibrators for organic chemical measurements,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 24, no. 6, pp. 407–415, 2019.

[26] S. Richter *et al.*, “Certification of a new series of gravimetrically prepared synthetic reference materials for n(236U)/n(238U) isotope ratio measurements,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 268, no. 7, pp. 956–959, 2010.

[27] K. Ishikawa *et al.*, “Preparation and characterization of organic calibration solutions for development of certified reference materials at the National Metrology Institute of Japan,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 13, no. 7, pp. 397–408, 2008.

[28] S. Iqbal, M. Rafique Asi, U. Hanif, M. Zuber, and S. Jinap, “The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; And evaluation of dietary intake,” *Food Chem.*, vol. 210, pp. 135–140, Nov. 2016.

[29] I. R. B. Olivares, G. B. Souza, A. R. A. Nogueira, G. T. K. Toledo, and D. C. Marcki, “Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis - Focus on food, water, soil, and sediment matrices,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 100, pp. 53–64, 2018.

[30] E. C. P. do Rego, E. de F. Guimarães, J. M. Rodrigues, R. C. Scarlato, R. I. Nogueira, and A. D. Pereira Netto, “Feasibility study for development of candidate reference material for food analysis: Chloramphenicol in milk powder,” *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 98, pp. 300–304, 2017.

[31] S. A. Wise *et al.*, “Two new marine sediment standard reference materials (SRMs) for the determination of organic contaminants,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 378, no. 5, pp. 1251–1264, 2004.

[32] S. Grimalt *et al.*, “Development of a new cucumber reference material for pesticide residue analysis: Feasibility study for material processing, homogeneity and stability assessment,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 11, pp. 3083–3091, 2015.

[33] B. Sejerøe-Olsen, R. Zeleny, H. Emons, F. Ulberth, and H. Saldanha, “Feasibility study for producing a carrot/potato matrix reference material for 11 selected pesticides at EU MRL level: Material processing, homogeneity and stability assessment,” *Food Chem.*, 2011.

[34] National Institute of Standards and technology NIST, “Standard reference material SRM2261- Chloridated pesticides in hexane,” Gaithersburg, Meryland, 2018.

[35] National Institute of Standards and technology NIST, “Standard reference material SRM2275 chlorinated pesticide solution in 2,2,24-trimethylpentane,” Gaithersburg, Meryland, 2020.

[36] Chemical Metrology & Analytical Science Division-National Institute of Metrology, “National Sharing Platform for Refernce Materials.” [Online]. Available: https://www.ncrm.org.cn/Web/MaterialEn/Components?autoID=7126&pageIndex=1 .

[37] T. Otake *et al.*, “Development of green onion and cabbage certified reference materials for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides,” *J. Agric. Food Chem.*, 2011.

[38] T. Otake *et al.*, “Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides,” *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1243–1249, 2013.

[39] T. Yarita *et al.*, “Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis,” *Talanta*, vol. 119, pp. 255–261, 2014.

[40] T. Otake, Y. Aoyagi, T. Yarita, and M. Numata, “Characterization of certified reference material for quantification of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, pp. 2569–2577, Jul. 2010.

[41] T. Otake *et al.*, “Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice.,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 18, pp. 8208–8212, Sep.

2009.

[42] M. Numata *et al.*, “Sediment certified reference materials for the determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides from the National Metrology Institute of Japan (NMIJ),” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 387, no. 7, pp. 2313–2323, 2007.

[43] J. S. M. Dabrio, S. Grimalt Brea, P. Shegunova, S. Harbeck, B. Sejerøe-Olsen, A.R. Fernández-Alba, “The certification of the mass fraction of pesticides in cucumber: ERM®-BC403 EUR 29243 EN,” 2018.

[44] D. W. M. Sin *et al.*, “Development of a candidate certified reference material of cypermethrin in green tea,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 721, pp. 110–114, 2012.

[45] D. W. M. Sin *et al.*, “S1 certification of alpha-endosulfan, beta-endosulfan, and endosulfan sulfate in a candidate certified reference material (organochlorine pesticides in tea) by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015.

[46] European Comission-Standards Measurements and Testing Programm, “The certification of the contents (mass fraction) of organochlorine pesticides in animal feed-BCR 115,” Brussels, Belgium, 1996.

[47] European Comission-Standards Measurements and Testing Programm, “The certification of the contents (mass fraction) of organochlorine pesticides in animal feed-BCR 187-188,” Luxembourg city, Luxembourg, 1989.

[48] National Institute of Standards and technology NIST, “Certificate of Analysis Standard Reference Material SRM1947- Lake Michigan Fish Tissue,” Gaithersburg, Meryland, 2007.

[49] S. Ahn, B. Kim, and E. Hwang, “Stability monitoring of pesticide residues in a Chinese cabbage certified reference material,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 32, no. 4, pp. 1365–1367, 2011.

[50] U. Faure and P. J. Wagstaffe, “Stability of reference materials,” *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 1993.

[51] P. McCarron, E. Wright, H. Emteborg, and M. A. Quilliam, “A mussel tissue certified reference material for multiple phycotoxins. Part 4: certification,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 1, pp. 95–106, 2017.

[52] F. G. M. Violante, C. de O. Rosas, E. de F. Guimarães, H. de C. Vital, N. O. C. Zúniga, and F. R. de Aquino Neto, “Feasibility study for the development of a certified

reference material of nitrofuran metabolites in chicken breast muscle from incurred samples," *Measurement*, vol. 129, pp. 368–374, 2018.

[53] H. Kodamatani, C. Maeda, S. J. Balogh, Y. H. Nollet, R. Kanzaki, and T. Tomiyasu, "The influence of sample drying and storage conditions on methylmercury determination in soils and sediments," *Chemosphere*, vol. 173, pp. 380–386, 2017.

[54] D. L. Ellisor, W. C. Davis, and R. S. Pugh, "Spiking and homogenization of biological matrices for production of reference materials using cryogenic processes," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 412, no. 22, pp. 5447–5451, 2020.

[55] E. Kurniawati, B. Ibrahim, and Desniar, "Homogeneity and stability of a secondary microbiological reference material candidate for Salmonella in fish matrix," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 404, no. 1, 2019.

[56] T. A. Dang and H.-J. Lunk, "Freeze drying: a novel method for preparation of solid analytical tungsten and molybdenum standards," *ChemTexts*, vol. 4, no. 3, p. 11, 2018.

[57] S.-W. Hyung, C.-H. Lee, and B. Kim, "Development of certified reference materials for accurate determination of fluoroquinolone antibiotics in chicken meat," *Food Chem.*, vol. 229, pp. 472–478, 2017.

[58] J. H. Kim, S. G. Choi, Y. S. Kwon, S. M. Hong, and J. S. Seo, "Development of cabbage reference material for multi-residue pesticide analysis," *Appl. Biol. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 15–23, 2018.

[59] B. Sejerøe-Olsen *et al.*, "PAHs in baby food: assessment of three different processing techniques for the preparation of reference materials," *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015.

[60] W. R. Hardstaff, W. D. Jamieson, J. E. Milley, M. A. Quilliam, and P. G. Sim, "Reference materials for domoic acid, a marine neurotoxin," *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 338, no. 4, pp. 520–525, 1990.

[61] C. A. Fraser *et al.*, "Preparation and certification of a biological reference material (CARP-1) for polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran congeners," *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 352, no. 1, pp. 143–147, 1995.

[62] P. Armishaw, J. M. Majewski, P. J. McLay, and R. G. Millar, "Development and certification of reference materials for residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in beef fat ACSL CRM 1 and 2," *Fresenius. J. Anal.*

*Chem.*, vol. 360, no. 6, pp. 630–639, 1998.

[63] A. Kiełbasa, R. Gadzała-Kopciuch, and B. Buszewski, “Reference Materials: Significance, General Requirements, and Demand,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2016.

[64] R. A. Perez *et al.*, “The preparation of certified calibration solutions for azaspiracid-1, -2, and -3, potent marine biotoxins found in shellfish,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 5, pp. 2243–2252, 2010.

[65] J. L. Bernal, M. J. Del Nozal, and J. J. Jiménez, “Influence of solvent and storage conditions on the stability of acaricide standard stock solutions,” *J. Chromatogr. A*, vol. 765, no. 1, pp. 109–114, 1997.

[66] K. Maštovská and S. J. Lehotay, “Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1040, no. 2, pp. 259–272, 2004.

[67] K. K. Sharma *et al.*, “Monitoring of purity and stability of CRMs of multiclass pesticides during prolonged storage before and after expiration,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 25, pp. 89–97, 2020.

[68] Y. Bian, Y. Wang, F. Liu, X. Li, and B. Wang, *The stability of four organophosphorus insecticides in stored cucumber samples is affected by additives*. Elsevier Ltd, 2020.

[69] E. Lugo Medina, C. García Gutiérrez, and R. D. Ruelas Ayala, “Nanotecnología y nanoencapsulación de plaguicidas,” *Rev. Soc. Cult. y Desarro. Sustentable*, vol. 6, no. 1, pp. 57–62, 2010.

[70] M. Nuruzzaman, M. M. Rahman, Y. Liu, and R. Naidu, “Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 7, pp. 1447–1483, 2016.

[71] L. Wang, X. Li, G. Zhang, J. Dong, and J. Eastoe, “Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations.,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 314, no. 1, pp. 230–235, Oct. 2007.

[72] S. Song, X. Liu, J. Jiang, Y. Qian, N. Zhang, and Q. Wu, “Stability of triazophos in self-nanoemulsifying pesticide delivery system,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 350, no. 1–3, pp. 57–62, 2009.

[73] X. Zhang and J. Liu, “Effect of Arabic Gum and Xanthan Gum on the Stability of Pesticide in Water Emulsion,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 4, pp. 1308–1315, Feb. 2011.

[74] Food and Agricultural Organization, “The International Code of Conduct on Pesticide Management,” Rome, 2014.

[75] OCDE/FAO, “OCDE/FAO Perspectivas agrícolas 2012-2021,” Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, 2013.

[76] V. Bardwick, Ed., *Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*, 3rd ed. 2016.

[77] Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart/EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, “DataPool EURL database,” 2006. .

[78] Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, “Estadisticas de plaguicidas 2019,” Bogotá, 2019.

[79] RStudio Team, “RStudio: Integrated Development for R.” Boston, 2020.

[80] D. A. Ahumada Forigua, “Reducción del efecto matriz en el análisis de residuos de Plaguicidas mediante Cromatografía de gases,” Universidad Nacional De Colombia, 2010.

[81] EU Reference Laboratory for Pesticides Requiring Single Residue Methods, “Analysis of Captan, Folpet and their respective metabolites Phthalimide and Tetrahydrophthalimide via LC-MS/MS either directly or following hydrolysis,” Stuttgart, 2019.

[82] J. L. Gastwirth, Y. R. Gel, and W. Miao, “The Impact of Levene’s Test of Equality of Variances on Statistical Theory and Practice,” *Stat. Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 343–360, 2009.

[83] D. Sud, J. Kumar, P. Kaur, and P. Bansal, “Toxicity, natural and induced degradation of chlorpyrifos,” *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 65, pp. 4807–4816, 2020.

[84] C. M. Menzie, “Metabolism of pesticides: update III,” 1980.

[85] S. E. Duirk and T. W. Collette, “Degradation of Chlorpyrifos in Aqueous Chlorine Solutions: Pathways, Kinetics, and Modeling,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 2, pp. 546–551, Jan. 2006.

[86] H. Liu *et al.*, “Oxidative degradation of chlorpyrifos using ferrate(VI): Kinetics and reaction mechanism,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 170, pp. 259–266, 2019.

[87] T. Lazarević-Pašti, B. Nastasijević, and V. Vasić, “Oxidation of chlorpyrifos, azinphos-methyl and phorate by myeloperoxidase,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 101, no. 3, pp. 220–226, 2011.

[88] Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart/EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, “DataPool EURL database,” 2006. [Online]. Available: https://www.eurl-pesticides-datapool.eu/Member/Compound/StabilityData.

[89] R. Djouaka *et al.*, “The Rapid Degradation of Lambda-Cyhalothrin Makes Treated Vegetables Relatively Safe for Consumption,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 7, p. 1536, Jul. 2018.

[90] R. Colombo, J. Yariwake, and M. Lanza, “Degradation Products of Lambda-Cyhalothrin in Aqueous Solution as Determined by SBSE-GC-IT-MS,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 29, pp. 2207–2212, 2018.

[91] Z. Chen, F. Maartens, H. Vega, S. Kunene, J. Gumede, and R. I. Krieger, “2,2-bis(4-Chlorophenyl)Acetic Acid (DDA), a Water-Soluble Urine Biomarker of DDT Metabolism in Humans,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 28, no. 6, pp. 528–533, Nov. 2009.

[92] H. Huang *et al.*, “Sources and transformation pathways for dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites in soils from Northwest Fujian, China.,” *Environ. Pollut.*, vol. 235, pp. 560–570, Apr. 2018.

[93] O`Brien, “DDT and related compounds,” in *Handbook of pollution prevention adn cleaner production:best prractices in agrochemical industry*, 1st ed., N. P. Cheremisinoff and P. E. Rosenfeld, Eds. Oxford: Academic Press, 2011, pp. 247–259.

[94] J. R. Plimmer, U. I. Klingebiel, and B. E. Hummer, “Photooxidation of DDT and DDE,” *Science (80-. ).*, vol. 167, no. 3914, pp. 67 LP – 69, Jan. 1970.

[95] J. E. Thomas, L.-T. Ou, and A. All-Agely, “DDE remediation and degradation.,” *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 194, pp. 55–69, 2008.

[96] A. S. Purnomo, T. Mori, I. Kamei, and R. Kondo, “Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 65, no. 7, pp. 921–930, 2011.

[97] J. Wang *et al.*, “Degradation pathway of triazole fungicides and synchronous removal of transformation products via photo-electrocatalytic oxidation tandem MoS2 adsorption,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 28, no. 13, pp. 16480–16491, 2021.

[98] E. Ueyama, N. Suzuki, and K. Kano, “Mechanistic study of the oxidative degradation of the triazole antifungal agent CS-758 in an amorphous form.,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 1, pp. 104–113, Jan. 2013.

[99] Y. Akiyama, N. Yoshioka, and M. Tsuji, “Pesticide Residues in Agricultural Products

Monitored in Hyogo Prefecture, Japan, FYs 1995–1999," *J. AOAC Int.*, vol. 85, no. 3, pp. 692–703, May 2002.

[100] J. Morales, J. A. Manso, A. Cid, and J. C. Mejuto, "Degradation of carbofuran and carbofuran-derivatives in presence of humic substances under basic conditions," *Chemosphere*, vol. 89, no. 11, pp. 1267–1271, 2012.

[101] L. P. de Melo Plese, L. C. Paraiba, L. L. Foloni, and L. R. Pimentel Trevizan, "Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields," *Chemosphere*, vol. 60, no. 2, pp. 149–156, 2005.

[102] Q. S. Lin, S. H. Chen, M. Y. Hu, M. R. U. Haq, L. Yang, and H. Li, "Biodegradation of Cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-S-01 from wastewater sludge," *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 8, no. 1, pp. 45–56, 2011.

[103] K. I. Al-Mughrabi, I. K. Nazer, and Y. T. Al-Shuraiqi, "Effect of pH of water from the King Abdallah Canal in Jordan on the stability of cypermethrin," *Crop Prot.*, vol. 11, no. 4, pp. 341–344, 1992.

[104] Á. Ambrus, "International Harmonization of Food Safety Assessment of Pesticide Residues," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 64, no. 1, pp. 21–29, 2016.

[105] M. W. Aktar, D. Sengupta, and A. Chowdhury, "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards," *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2009.

[106] The European Union, "RASFF-The Rapid Alert System for Food and Feed-Annual Report," 2020.

[107] P. Atkins, J. Blount, T. Grim, M. Phillips, and J. Wong, "Reference Material Use in Trace Analysis," 2021.

[108] S. Rückold, K. H. Grobecker, and H.-D. Isengard, "Water as a source of errors in reference materials," *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 370, no. 2, pp. 189–193, 2001.

[109] P. McCarron, S. Burrell, and P. Hess, "Effect of addition of antibiotics and an antioxidant on the stability of tissue reference materials for domoic acid, the amnesic shellfish poison," in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007.

[110] A. Marulanda, M. Ruiz-Ruiz, and M. Cortes-Rodríguez, "Influence of spray drying process on the quality of avocado powder: A functional food with great industrial potential," *Vitae*, vol. 25, no. 1, pp. 37–48, 2018.

[111] Asociación Española de Normalización, *Método múltiple para la determinación de*

*residuos de plaguicidas mediante análisis basados en GC y LC tras extracción con acetonitrilo y limpieza mediante SPE por dispersión- Método QuEChERs*. España, 2019.

[112] B. Akdeniz, G. Sumnu, and S. Sahin, “The effects of maltodextrin and gum Arabic on encapsulation of onion skin phenolic compounds,” *Chem. Eng. Trans.*, vol. 57, pp. 1891–1896, 2017.

[113] M. Najaf Najafi, R. Kadkhodaee, and S. A. Mortazavi, “Effect of Drying Process and Wall Material on the Properties of Encapsulated Cardamom Oil,” *Food Biophys.*, vol. 6, no. 1, pp. 68–76, 2011.

[114] A. Wilkowska, W. Ambroziak, A. Czyżowska, and J. Adamiec, “Effect of Microencapsulation by Spray Drying and Freeze Drying Technique on the Antioxidant Properties of Blueberry (Vaccinium myrtillus) Juice Polyphenolic Compounds,” *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 66, no. 1, pp. 11–16, 2016.

[115] D. Ogrodowska, M. Tańska, W. Brandt, and S. Czaplicki, “Impact of the Encapsulation Process by Spray- and Freeze-Drying on the Properties and Composition of Powders Obtained from Cold-Pressed Seed Oils with Various Unsaturated Fatty Acids,” *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. 241–252, 2020.

[116] E. F. do E. Santo, L. K. F. de Lima, A. P. C. Torres, G. de Oliveira, and E. H. G. Ponsano, “Comparison between freeze and spray drying to obtain powder Rubrivivax gelatinosus biomass,” *Food Sci. Technol.*, vol. 33, no. 1, pp. 47–51, Feb. 2013.

[117] M. S. Levenson *et al.*, “An Approach to Combining Results From Multiple Methods Motivated by the ISO GUM,” *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, vol. 105, no. 4, pp. 571–579, Aug. 2000.

[118] A. A. Veroniki *et al.*, “Methods to estimate the between-study variance and its uncertainty in meta-analysis,” *Res. Synth. Methods*, vol. 7, no. 1, pp. 55–79, Mar. 2016.