



Caracterización de materiales de referencia certificados en persea americana y
coffea arábica en el CENAM

BAJO LA OPCIÓN:
TITULACIÓN INTEGRAL
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA:
KATIA ITZEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ

ASESOR
M. A. C. ELODIA CLAUDIA GUERRERO ORTIZ

SINODALES:
M. en C. ROSA SILVA BADILLO
M. en C. RUBÉN VÁZQUEZ ZÚÑIGA

Pachuca de soto, Hgo. MARZO 2024

72 páginas





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Pachuca
Subdirección Académica
Depto. de Ingeniería Química y Bioquímica

Pachuca de Soto Hidalgo, **26/Febrero/2024**

No. de oficio: **DIQyB-005-2024**

Asunto: **ACEPTACIÓN DE TEMA Y OPCIÓN**

**C. KATIA ITZEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ
PRESENTE**

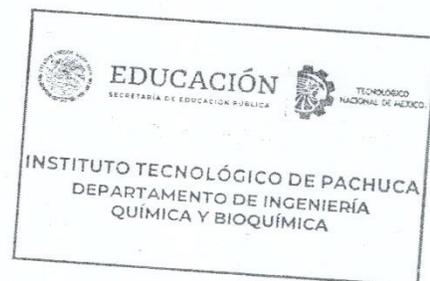
Con el presente me permito informarle que el tema **Caracterización de materiales de referencia certificados en persea americana y coffea arábica en el CENAM** ha sido **ACEPTADO** para ser presentado por la **OPCIÓN I (TESIS PROFESIONAL)** contemplada en la normatividad vigente para tal efecto.

Lo anterior se le ha designado como **ASESORA** a la **M.A.C. ELODIA CLAUDIA GUERRERO ORTIZ** y como comisión revisora a la **M. en C. ROSA SILVA BADILLO** y **M. en C. RUBÉN VÁZQUEZ ZÚÑIGA**. Una vez hecha la revisión final se liberará por dicho comité para su impresión y proceder a sustentar al **ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL**

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
"El Hombre Alimenta el Ingenio en Contacto con la Ciencia"

**DRA. ALEJANDRA FLETES GÓMEZ
JEFA DEL DEPTO. DE ING. QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**



c.c.p. archivo
AFG/bfa



Carretera México - Pachuca Km. 87.5, Col. Venta Prieta C.P. 42083 Pachuca de Soto,
Hidalgo. Tels. 771 7113073, 771 7113596, 771 7113140, 771 7115119 y 771 7113399
e-mail: ciquimica@pachuca.tecnm.mx | tecnm.mx



Pachuca de Soto, Hgo., a 07 de Marzo de 2024

Oficio No. DIQyB/005/2024

Asunto: Liberación de Proyecto para Titulación

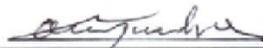
C. KATIA ITZEL MARTÍNEZ MARTÍNEZ
No. de Control: 18201009
Egresada del Programa Educativo de Ingeniería Química y Bioquímica
PRESENTE

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

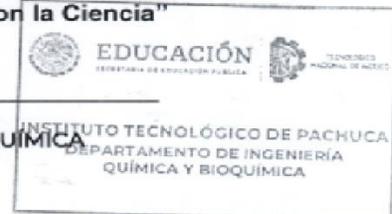
Nombre del proyecto:	Caracterización de materiales de referencia certificados en persea americana y coffea arábica en el CENAM
Producto:	OPCIÓN I (TESIS PROFESIONAL)

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
"El Hombre Alimenta el Ingenio en Contacto con la Ciencia"



DRA. ALEJANDRA FLETES GÓMEZ
JEFA DEL DEPTO. DE ING. QUÍMICA Y BIOQUÍMICA



c.c.p. - Expediente.
AFC/bfa



Carretera México - Pachuca Km. 87.5, Col. Venta Prieta C.P. 42083 Pachuca de Soto,
Hidalgo. Tels. 771 7113073, 771 7113596, 771 7113140, 771 7115119 y 771 7113399



DEDICATORIA

A mi amor chiquito Elián, eres mi tesoro y la fuente más pura de mi inspiración, este trabajo fue elaborado solo pensando en ti.

A mis padres, Dominga y Luis, no es fácil llegar, se necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobre todo apoyo y amor como el que he recibido de ustedes.

A mis hermanos, Luis Gustavo y Mariana, por ser mi sostén y amigos por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Metrología

Por permitirme formar parte de su centro de trabajo y con el apoyo de sus instalaciones y laboratorios para la realización de esta investigación.

A la Dra. Rosa del Carmen Vázquez García

Una gran investigadora y ser humano. Con su paciencia, conocimiento, apoyo, motivación y amistad fue posible esto, gracias infinitas.

A mi asesor de proyecto

M. en C. Marco Antonio Ávila Calderón por transmitirme el conocimiento necesario para la realización de este trabajo.

Al personal de la Dirección de Análisis Orgánico en CENAM

A los entrañables compañeros de trabajo, que me brindaron su apoyo durante la realización de este proyecto, a la QFB Adriana Cardona, a la I.Q. Itzel Santiago, a la M. en C. Laura Regalado, al I.Q. Víctor Serrano y a la I.Q. Berenice Mercado, gracias infinitas por acompañarme en este punto importante de mi crecimiento profesional.

A la M. A. C. Elodia Claudia Guerrero Ortiz

Por impulsar mi yo investigador, pero sobre todo la constancia que le dedicó a guiarme a culminar esta investigación, usted fue un pilar importante para sustentar mi tesis.

A la M. en C. Rosa Silva Badillo y al M. en C. Rubén Vázquez Zúñiga

A quienes expreso mi gratitud por contribuir en la dedicación a revisar mi trabajo.

RESUMEN

El uso intensivo de plaguicidas en cultivos de vegetales propicia su persistencia en estos, y dependiendo de la concentración y toxicidad del plaguicida puede llegar a perjudicar su venta a nivel nacional e internacional y aunado a ello repercutir en la salud de los consumidores. Por tal motivo, los gobiernos de Japón, Estados Unidos, entre otros, establecen límites máximos de residuos (LMR) para regular cada plaguicida en un alimento en particular. El CENAM mantiene un estrecho contacto con otros laboratorios nacionales, como es el caso del Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC), perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y con organismos internacionales relacionados, con el fin de asegurar el reconocimiento internacional de los patrones nacionales de México y consecuentemente promover la aceptación de los productos y servicios de nuestro país para un mejor desarrollo económico y social de México y así incidir positivamente en el comercio, la competitividad industrial, el medio ambiente y el bienestar de la población. El objetivo del presente trabajo consistió en realizar un monitoreo sobre la concentración de los plaguicidas diazinón, dimetoato y monocrotofos en cereza de café, así como de acefato y metamidofos en aguacate

Palabras clave: *Material de referencia certificado, incertidumbre, dimetoato, monocrotofos, diazinón, acefato, metamidofos.*

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE ECUACIONES	X
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 JUSTIFICACIÓN	2
1.2 OBJETIVO GENERAL	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
CAPITULO 2. FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1 ESTADO DEL ARTE	4
2.2 MATERIAL DE REFERENCIA	7
2.2.1 Importancia de los materiales de referencia.....	7
2.3 MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC)	7
2.3.1 Consideraciones de un material de referencia certificado	8
2.3.2 Caracterización del material.....	8
2.4 AGUACATE	9
2.4.1 Importación del aguacate mexicano	11
2.5 CEREZA DE CAFÉ	13
2.6 PLAGUICIDAS	15
2.6.1 Clasificación de los plaguicidas	16
2.6.2 Uso y control de plaguicidas en México	18
	IV

2.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	19
2.7.1 Sistema de extracción en fase sólida dispersa	19
2.7.2 Estándar interno	21
2.7.3 Identificación de compuestos.....	22
2.7.3.2 Técnicas de identificación: Detectores	24
2.8 INOCUIDAD ALIMENTARIA	25
2.8.1 Laboratorios de inocuidad.....	26
2.9 SEGURIDAD ALIMENTARIA.....	27
2.10 LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR)	27
2.11 NORMA ISO 22000 DE SEGURIDAD ALIMENTARIA	28
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO	29
3.1 PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA EN MUESTRA 1	29
3.1.1 Alcance	29
3.1.2 Propósito	29
3.1.3 Equipo y material.....	29
3.1.4 Reactivos.....	30
3.1.5 Descripción de las actividades.....	31
3.1.6 Cálculos.....	37
3.1.7 Resultados.....	43
3.1.8 Conclusiones.....	44
3.1.9 Bibliografía.....	44
3.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA EN MUESTRA 2	46
3.2.1 Alcance	46

3.2.2 Propósito	46
3.2.3 Equipo y material.....	46
3.2.4 Reactivos.....	47
3.2.5 Descripción de las actividades.....	47
3.2.6 Cálculos.....	52
3.2.7 Resultados.....	57
3.2.8 Conclusiones.....	59
3.2.9 Bibliografía.....	59
3.3 EVALUACIÓN O IMPACTO ECONÓMICO.....	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aguacate Hass	9
Figura 2. Principales destinos del aguacate Hass	12
Figura 3. Fruto de cereza de café	13
Figura 4. Principales productores de café en el mundo	14
Figura 5. Balanza analítica	31
Figura 6. Frascos de MRC con blanco y muestra de los plaguicidas en cereza de café	33
Figura 7. Tubos Eppendorf con el blanco adicionado	34
Figura 8. Centrífuga utilizada para la homogenización de la muestra	35
Figura 9. Muestra concentrada en el rotavapor	36
Figura 10. Extractos en tubos de vidrio para evaporación con nitrógeno	36
Figura 11. Viales con los 5 niveles	37
Figura 12. Cromatograma de los tiempos de retención de los plaguicidas	40
Figura 13. Curva de calibración para el diazinón sin estándar interno	41
Figura 14. Curva de calibración del diazinón con estándar interno	42
Figura 15. Curva de calibración para el monocrotofos sin estándar interno	42
Figura 16. Curva de calibración para el monocrotofos con estándar interno	43
Figura 17. Nivel 1 del blanco del monitoreo	45
Figura 18. Frasco de aguacate libre de plaguicidas (blanco)	49
Figura 19. Muestras de aguacate en tubos Eppendorf	50
Figura 20. Filtración al vacío	51
Figura 21. Proceso de extracción mediante los cartuchos de sílice	51
Figura 22. Cromatograma que muestra la señal del nivel 3	53
Figura 23. Curva de calibración 1 para el metamidofos	54

Figura 24. Curva de calibración 1 para el acefato	54
Figura 25. Curva de calibración 2 para el acefato	57
Figura 26. Curva de calibración 2 para el metamidofos	58
Figura 27. Propiedades de los disolventes utilizados para el proyecto	64
Figura 28. Tiempos de retención para el nivel 1 del segundo monitoreo	65
Figura 29. Tiempos de retención para el nivel 2 del segundo monitoreo	65
Figura 30. Tiempo de retención para el nivel 3 del segundo monitoreo	66
Figura 31. Tiempo de retención del nivel 4 para el segundo monitoreo	66
Figura 32. Tiempo de retención para el nivel 5 del segundo monitoreo	67
Figura 33 Cromatograma del diazinón con los iones buscados más importantes.....	67
Figura 34 Cromatograma del monocrotofos con los iones buscados más importantes	68
Figura 35 Cromatograma del dimetoato con los iones buscados más importantes	68
Figura 36 Biblioteca del NIST que muestra los componentes del diazinón	69
Figura 37 Biblioteca del NIST que muestra los componentes del monocrotofos	69
Figura 38 Biblioteca del NIST que muestra los componentes del Dimetoato	70
Figura 39 Cromatograma que muestra las señales de los plaguicidas de monitoreo	71
Figura 40 Cromatograma con los picos de acefato y metamidofos	72
Figura 41 Cromatograma del nivel 1 del monitoreo.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Estado del Arte	4
Tabla 2. LMR para plaguicidas de estudio	18
Tabla 3. Propiedades de detectores para GC.....	24
Tabla 4 Equipo utilizado.....	29
Tabla 5. Características de los reactivos empleados en el análisis de plaguicidas	30
Tabla 6. Concentración de las soluciones madre en mg/kg	32
Tabla 7. Concentración de los plaguicidas en la disolución de cada nivel.....	37
Tabla 8. Iones que deben encontrarse en mayor concentración.....	38
Tabla 9. Concentraciones nuevas para el monitoreo.....	39
Tabla 10. Datos para grafico de curva de calibración sin estándar interno.....	39
Tabla 11 Equipo utilizado.....	46
Tabla 12 Reactivos utilizados	47
Tabla 13. Condiciones de los mensurando utilizados para el monitoreo de aguacate	48
Tabla 14. Concentración para preparar la curva de calibración de acefato	52
Tabla 15. Concentración para preparar la curva de calibración de metamidofos	53
Tabla 16. Concentraciones nuevas de los mensurando.....	55
Tabla 17. Concentraciones para la curva de calibración 2 del acefato	56
Tabla 18. Concentraciones para la curva de calibración del metamidofos	56

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1 Cálculo utilizado para determinar la concentración de cada nivel en disoluciones madre de aguacate.....	52
Ecuación 2. Cálculo del volumen para la concentración de la solución madre.....	55
Ecuación 3. Cálculo de la concentración a partir de la recta obtenida para el plaguicida de acefato	57
Ecuación 4 Cálculo de a concentración a partir de la recta obtenida para el plaguicida de metamidofos	58

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción de alimentos de origen vegetal inocuos, sin presencia de residuos químicos que atenten contra la salud de los consumidores, constituye una preocupación importante a escala mundial y demanda soluciones urgentes por sus implicaciones en la salud pública y el comercio internacional de los alimentos.

El origen de la presencia de residuos ilegales de plaguicidas en productos agrícolas se debe principalmente al uso no autorizado que se hace de estos productos en el campo, en muchos de los casos, el agricultor no sigue las recomendaciones de uso especificadas en la etiqueta del plaguicida en cuanto a dosis, número y momento de las aplicaciones, cultivos autorizados y cumplimiento de los intervalos de seguridad, por lo que es necesario concentrar esfuerzos en identificar las zonas donde se hace un uso inadecuado de plaguicidas, ocasionando conflictos comerciales (FAO, Inocuidad y calidad de alimentos, 2023).

En México, anteriormente el conocimiento que se tenía sobre los usos no autorizados de plaguicidas provenía de la información proporcionada por los países importadores de productos agrícolas, los cuales rechazan embarques que contienen residuos de plaguicidas que no cuentan con un límite máximo de residuos o estos rebasan el nivel permisible (Jahaziel Días Vallejo, 2021).

El desarrollo de este tipo de materiales surge con la necesidad de garantizar la calidad de los productos agrícolas. Debido a la problemática para exportar vegetales, algunos procesadores vegetales junto con laboratorios que miden residuos de plaguicidas solicitaron a CENAM el desarrollo de materiales de referencia en matriz natural con el fin de contar con materiales de referencia certificados (MRC) que les permita evaluar los métodos de análisis para determinar residuos de plaguicidas en vegetales y al mismo tiempo, estos materiales de referencia certificados sean de utilidad para evaluar la competencia de los laboratorios que miden residuos de plaguicidas en vegetales (Uribe, 2015).

Estos laboratorios podrán con certeza evaluar que los productos agrícolas no contengan residuos de plaguicidas no autorizados y que demuestren que estos no rebasen los límites máximos permisibles, con el objetivo de reducir los rechazos en la exportación de productos vegetales por contaminación de plaguicidas.

Con ello los productores y empaques nacionales de productos de origen agrícola fortalecen sus actividades dando certeza al consumidor nacional e internacional de contar con la aplicación eficaz de un Sistema de Reducción de riesgos de Contaminación apoyados en instrumentos legales, técnico y científicos (Doménech, 2004).

En el presente trabajo se desglosa la metodología para realizar la caracterización de los materiales de referencia certificados sobre plaguicidas en cereza de café y aguacate con el fin de recertificarlo.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Los materiales de referencia certificados (MRC) se utilizan ampliamente como patrones de medición de cantidad de sustancia y de otras magnitudes químicas y físicas. Es indispensable que estos materiales de referencia sean trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI) con el fin de que pueda establecerse una cadena de trazabilidad completa desde los laboratorios de campo hasta las unidades del SI.

Los materiales de referencia certificados en plaguicidas son empleados en la producción de varios vegetales con el fin de asegurar la calidad del fruto para su exportación, pero sobre todo de fortalecer a los laboratorios que realizan dichas mediciones de la inocuidad de los frutos y vegetales que se consumen tanto en México como en el extranjero.

Los MRC son de utilidad en los laboratorios para verificar la exactitud de las mediciones, implican un impacto ambiental enorme al trabajar con MRC en plaguicidas porque no solo son el marco de referencia para poder realizar los controles pertinentes de los residuos que acaban en el aire, el suelo o el agua, sino que al ser vertidos en los

vegetales implica tener en cuenta la inocuidad de los alimentos, ya que estos repercuten en la salud de los seres humanos.

Genera además un impacto económico, pues en vista de que estos alimentos se comercializan a gran escala tanto nacional como internacionalmente, deben cumplir con estándares de calidad propios para consumo, libres de organismos que hagan que la durabilidad de los alimentos sea menor.

El fin de contar con MRC, permite evaluar los métodos de análisis para determinar residuos de plaguicidas en vegetales y al mismo tiempo estos materiales de referencia certificados sean de utilidad para evaluar la competencia de los laboratorios ya que al contar con tecnología actualizada brindan información concreta, verídica y confiable de sus mediciones.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Incrementar la disponibilidad de material de referencia certificado MRC que están a la venta.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la fracción masa de diazinón y monocrotofos en Material de Referencia de matriz de cereza de café para la evaluación de estabilidad de este.
2. Caracterizar la fracción de masa de acefato de aguacate para su estudio de estabilidad y asignación de nuevo valor de material de referencia.
3. Realizar la evaluación estadística de la estabilidad a largo plazo de los materiales de referencia.
4. Implementar los métodos para la extracción y cuantificación de dichos compuestos y evaluar la estabilidad de los plaguicidas en cereza de café y aguacate.

CAPITULO 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 ESTADO DEL ARTE

Tabla 1

Estado del Arte

Proyecto	Tipo de trabajo	Descripción	Alcance
Criterios y especificaciones de desempeño de métodos para la evaluación de laboratorios coadyuvantes en el análisis de plaguicidas (Servicio Nacional de Sanidad, 2018).	Informe de evaluación de métodos	El análisis, se hace sobre un lote de extracción inicial de muestras que debe de contener elementos de cuantificación en los que aparecen un blanco reactivo y un blanco matriz, así como la realización de curvas de calibración con al menos cuatro niveles de concentración, y llevar a cabo controles de calidad de al menos una muestra duplicada del lote.	Los materiales de referencia, soluciones stock y soluciones estándares de calibración se deben almacenar a bajas temperaturas, preferentemente en un congelador exento de luz y bajo condiciones que minimicen la velocidad de degradación.
Ensayo de aptitud para la determinación de plaguicidas en jitomate (Calderón, Ensayo de aptitud para la	Informe de centro de investigación	Determinar mediante ensayos de aptitud el desempeño de las mediciones realizadas en residuos de plaguicidas para la inocuidad alimentaria en vegetales, utilizando un	Los resultados obtenidos son reconocidos para acreditaciones nacionales e internacionales, el CENAM avala la certeza que los productos agrícolas no contengan residuos de

determinación de plaguicidas en jitomate, 2019).		material de referencia certificado como muestra ciega	plaguicidas no autorizados en los vegetales, principalmente en el jitomate.
Producción piloto de un material de referencia en frutas con alto contenido de agua como herramienta para evaluación de laboratorio que trabajan en análisis de residuos de plaguicidas (Rozo, 2020).	Tesis	El material se preparó empleando gulupa como matriz y diez plaguicidas de distintas propiedades fisicoquímicas; para la caracterización del material se desarrolló y validó un método de medición exacto y análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem CL-MS/MS.	El lote producido resultó ser homogéneo, por otro lado, los resultados del estudio de estabilidad permitieron concluir que -20 °C es la temperatura a la cual debe transportarse y almacenarse el MR antes y durante su participación en ensayos de Inter comparación.
Plaguicidas en alimentos: riesgo a la salud y marco regulatorio en Veracruz (Jahaziel Días Vallejo, 2021).	Artículo científico	Se midieron las concentraciones de residuos de plaguicidas en productos vegetales y se compararon con los valores establecidos como límites de seguridad en el marco regulatorio del uso de plaguicidas. Se calculó el cociente de peligro y sus posibles efectos en la salud.	Se encontraron residuos de plaguicidas altamente peligrosos en los alimentos, los cuales están prohibidos por los convenios internacionales ambientales derivado de su potencial para causar efectos a la salud y el medio ambiente, por lo que el marco regulatorio de México debe actualizarse y ser dinámico conforme se avance en el conocimiento de los efectos adversos de los plaguicidas en la salud

<p>Debate sobre el seguimiento de la pureza y la estabilidad del material de referencia certificado de plaguicidas durante el almacenamiento prolongado (FAO, Documento de debate sobre el seguimiento de la pureza y la estabilidad del material de referencia certificado de plaguicidas durante el almacenamiento prolongado, 2022).</p>	<p>Documento de debate</p>	<p>Se tuvo en cuenta el asesoramiento de la FAO, la OMS, así como los documentos publicados por organizaciones internacionales, como las guías ISO pertinentes, como lo son la guía ISO 33:2015 relacionada con los materiales de referencia, la norma ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, por mencionar algunos.</p>	<p>El uso en los sistemas de medición de MRC caducado con la pureza y estabilidad validadas no solo garantizará la continuidad de su uso en los laboratorios, sino que tendrá también un efecto económico por el ahorro de costes de adquisición de nuevo MRC</p>
<p>Ensayo de aptitud de determinación cualitativa y cuantitativa de plaguicidas en aguacate liofilizado (Calderón, Ensayo de aptitud de determinación cualitativa y cuantitativa de plaguicidas en aguacate liofilizado, 2020).</p>	<p>Preprotocolo</p>	<p>Se determina el desempeño sobre las mediciones de plaguicidas para la inocuidad alimentaria del aguacate, se utilizaron dos materiales de referencia certificados como muestra ciega para evaluar su desempeño con base a valores de certificados, utilizando el estadístico del error cuadrático medio relativo y así como el valor asignado por CENAM para dicho mensurado.</p>	<p>Participar en ensayos de aptitud, permite a los laboratorios que miden residuos de plaguicidas evaluar su desempeño en un método objetivo para demostrar la confiabilidad de los resultados de medición.</p>

2.2 MATERIAL DE REFERENCIA

Un material de referencia es un material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades específicas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas (Metrología, 2018).

2.2.1 Importancia de los materiales de referencia

Los materiales de referencia certificados son utilizados por muchos laboratorios en su programa de aseguramiento de calidad analítica para validar procedimientos y estimar la exactitud en las mediciones. Se utilizan principalmente para

- a. Calibrar y/o verificar patrones de equipos de medición
- b. Validar métodos analíticos
- c. Comprobar la exactitud de los resultados
- d. Comprobar el desempeño de un laboratorio o un analista
- e. Asignar valores e incertidumbres de medición de magnitudes del mismo tipo a otros materiales verificar el correcto uso del método o detectar errores en su aplicación

2.3 MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO (MRC)

Un material de referencia certificado es un material para el cual el valor de una o varias de sus propiedades se ha certificado, es decir, se ha determinado cuál es su valor y se acompaña de incertidumbre con un nivel de confianza declarado que refleja la dispersión de los valores medidos para la o las propiedades, por lo tanto, los materiales de referencia certificados son referencias confiables para asegurar la calidad de las mediciones que realizan los laboratorios de ensayo (Metrología, 2018).

Todos los materiales de referencia certificados que ofrece el CENAM reúnen los requisitos que especifican las normas NMX-CH-161-IMNC a la NMX-CH-165-IMNC y la NMX-EC-17025-IMNC-2006 (materiales de referencia- Contenido de certificados y etiquetas); y se utilizan para calibrar y/o verificar patrones y equipos de medición, para validar métodos analíticos, comprobar la exactitud de los resultados, comprobar el

desempeño de un laboratorio o un analista y asignar valores e incertidumbres de medición de magnitudes del mismo tipo a otros materiales (Física, 2020).

2.3.1 Consideraciones de un material de referencia certificado

Un punto importante de un material de referencia es la vida de anaquel, el cual es el tiempo que permanece estable bajo condiciones apropiadas de almacenamiento. Esta se puede mejorar dependiendo de los mecanismos naturales que afectan la estabilidad del material. Por ejemplo, el reducir el contenido de humedad es una de las primeras opciones que se toman en cuenta. En los materiales de referencia de estado sólido la reducción del tamaño de partícula juega un papel muy importante.

Normalmente se reduce el tamaño de partícula debido a los métodos de medición que son usados en la certificación y por los usuarios del MR, así como también al tomar una muestra mínima aceptable. Posterior a la reducción de tamaño el material debe ser dividido en porciones apropiadas para lo cual se utilizan equipos sub divisores dependiendo del tipo y tamaño de la muestra dividir. Un requisito básico es que el método usado garantice dentro de ciertos límites, que la primera muestra obtenida tendrá las mismas características que la última.

A pesar de todos los esfuerzos puestos en la preparación y conservación del material, puede que haya algo de heterogeneidad hoy e inestabilidad, la cual se debe tomar en cuenta en la estimación de incertidumbre. Hoy después de los estudios de homogeneidad y estabilidad viene el proceso de caracterización del material.

2.3.2 Caracterización del material

Puede llevarse a cabo mediante un solo método, el primario, el uso de varios métodos, de principios de medición diferente y por medio de un estudio inter-laboratorio. En cualquier caso, los resultados obtenidos con los métodos de medición usados deben ser trazables a referencias establecidas o preferentemente a las unidades del sistema internacional.

El establecimiento de la trazabilidad de los resultados de medición es esencial en un material de referencia. O como se publiquen las guías ISO 30 y 35, un material de referencia puede ser certificado solamente si hay un establecimiento de incertidumbre con una trazabilidad demostrada. Entre mejor sea la ejecución de los métodos de medición, en términos de incertidumbre y trazabilidad mejor servirá el material de referencia para los intereses de los usuarios.

El método de medición utilizado para el estudio de homogeneidad debe tener buena repetibilidad. Para el estudio de estabilidad, en el que con frecuencia las muestras se miden en diferentes días, la reproducibilidad del método de medición esa es una importancia.

2.4 AGUACATE

El aguacate (*Persea americana*) perteneciente a la familia laurácea es originario en México y Guatemala. Los primeros indicios de su consumo en México datan de los años 8,000 B.C. En el mundo existen aproximadamente 400 variedades de aguacates, que difieren en la forma de la fruta, color y peso (150-350 gr). El aguacate se clasifica en tres razas hortícolas (Mexicana, Guatemalteca y Antillana) y seis clases (Hass, Fuerte, Criollo, Bacón, Pinkerton, Gwen y Red).

Figura 1

Aguacate Hass



El fruto **Figura 1**, es una drupa de color verde claro a verde oscuro y de violeta a negro con cáscara rugosa, pulpa verde amarillenta y con un hueso central grande. El árbol de aguacate puede alcanzar alturas hasta de 20 metros, cuando es cultivado comercialmente no se deja crecer más de 5 metros para facilitar las labores culturales como prácticas de control fitosanitario, poda, fertilización foliar y cosecha.

El aguacate mexicano, en particular la variedad Hass contribuye a la economía nacional con más de 1 millón de toneladas, que representa más del 30% de la producción mundial. Solo en el estado de Michoacán se produce el 80.2% de la producción nacional. Los principales países consumidores del aguacate mexicano son Estados Unidos, Japón y Canadá, sin embargo, los japoneses por considerarlo un producto de alta calidad lo aprecian más que en los otros dos países. Esto implica que el mercado japonés sea clave para México y sus especificaciones de inocuidad, prioritariamente en plaguicidas, son un requisito fundamental por los productores.

El cultivo del aguacate es atacado por ácaros e insectos, los cuales causan daños a la planta, afectan la calidad de los frutos y producen mermas en la producción. El manejo fitosanitario del cultivo del aguacate está regulado por la norma oficial mexicana NOM-066-FITO-2002 (Especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del aguacate). Con base en esta norma se implementan campañas para el control y erradicación de las plagas reglamentadas del aguacatero y obtener zonas de producción libres de plagas (Campos, 2018).

Además, el cultivo del aguacate es susceptible a enfermedades que generan incrementos en los costos de producción disminuyendo la rentabilidad del cultivo. Las plagas y enfermedades afectan la calidad de la fruta y limitan su comercialización y exportación. El control de las plagas y enfermedades en campo se puede realizar de dos maneras, 1) control químico utilizando productos permitidos y 2) por medio del control cultural. Actividades que permitirán por un lado reducir los riesgos fitosanitarios de plagas y enfermedades, y por el otro, producir frutas libres de residuos de productos químicos como plaguicidas. Obteniéndose aguacate que cumpla con los requerimientos establecidos en las regulaciones de los diferentes países como son los límites máximos residuales (LMR) para la comercialización y movilización del aguacate mexicano en sus territorios.

2.4.1 Importación del aguacate mexicano

En 1914 Estados Unidos prohibió la importación de aguacate mexicano argumentando la presencia de plagas como gusano barrenador del hueso y ramas. En 1997, el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS), perteneciente al Departamento de Agricultura de los EE. UU. (USDA) aprobó la importación de aguacate Hass mexicano de algunos municipios de Michoacán a ciertos estados del noreste de dicho país. Quedando condicionada dicha actividad comercial al cumplimiento de una serie de requisitos fitosanitarios para el control de plagas cuarentenarias que deben cumplir los productores y empaques (Campos, 2018).

La APEAM (Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán AC) se constituyó en 1997 como otro requisito solicitado por la USDA (Huacuja, 2008). En 2015 se publica en el Federal Register las reglas para permitir la importación de aguacate Hass fresco a Estados Unidos de todo México, no solo de Michoacán.

Siendo Jalisco el primer estado elegible para incorporarse al programa de exportación de aguacate Hass debido a que se encuentra preparado para cumplir con los requerimientos establecidos en la regulación vigente.

Actualmente, México exporta aguacate **Figura 2**, Hass a países como Estados Unidos, Francia, Japón, Canadá, China, Chile, Australia, entre otros. El aguacate mexicano cuenta con el sello de Calidad Suprema que garantiza los más altos estándares de calidad e inocuidad a nivel nacional e internacional. Sin embargo, en ocasiones se presentan alertas sanitarias debidas a violaciones a los límites de residuos de plaguicidas como fue el caso de Japón en 2011 que rechazó 60 toneladas del fruto de aguacate mexicano al muestrear dos contenedores y encontrar residuos de plaguicidas, por que detectaron la presencia de acefato y metamidofos.

Figura 2

Principales destinos del aguacate Hass

	2015	2016
Estados Unidos	1,528.8	1,710.9
Japón	106.2	155.2
Canadá	103.5	149.8
España	15.9	38.3
Francia	19.3	37.9
Holanda	9.4	36.1
El Salvador	31.2	24.4
China	25.1	23
Honduras	17	17.6
Hong Kong	2.4	5.1

Nota: Representación en toneladas

Por esta razón los productores de aguacate solicitaron el apoyo al CENAM, a través de la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de Michoacán, APEAM, solicitando llevar a cabo ensayos de aptitud para los laboratorios de control calidad de su producto, debido a que los contenedores rechazados ya habían sido analizados por estos laboratorios de servicio, en el que se reportaba que no contenían los plaguicidas.

Las importaciones de aguacate mexicano a Japón han crecido ocho veces en valor, al pasar de poco menos de 20 millones de dólares a 160 millones en el 2019, aunado a ello los japoneses pagan en promedio 20% mejor el aguacate que en otros países, principalmente porque demandan producto de alta calidad.

Con estos datos, resulta claro que la tendencia en las exportaciones de aguacate mexicano se ven direccionadas a Japón, es por eso por lo que este mercado se convirtió en el segundo más importante para México, cuya demanda ha tenido un crecimiento explosivo en los últimos 15 años.

2.5 CEREZA DE CAFÉ

Se llama café o cafeto a un enebro de árboles de la familia de las rubiáceas, a sus semillas y a la bebida que se prepara con ellas. Hay más de treinta especies, pero destacan tres: la arábica, la cenephora y la liberica. Al fruto se le dice cereza, uva o capulín y esta recubierto de unas cascarillas muy delgadas que se llama pergamino. La semilla del café contiene una compleja mezcla de componentes químicos.

El café **Figura 3**, es el segundo producto comercializado de mayor valor económico a nivel mundial, después del petróleo. Como producto agrícola es susceptible a plagas y enfermedades, para el control de estos, muchos productores utilizan plaguicidas químicos sintéticos, pero la presencia de residuos de estos es una barrera arancelaria.

Figura 3

Fruto de cereza de café



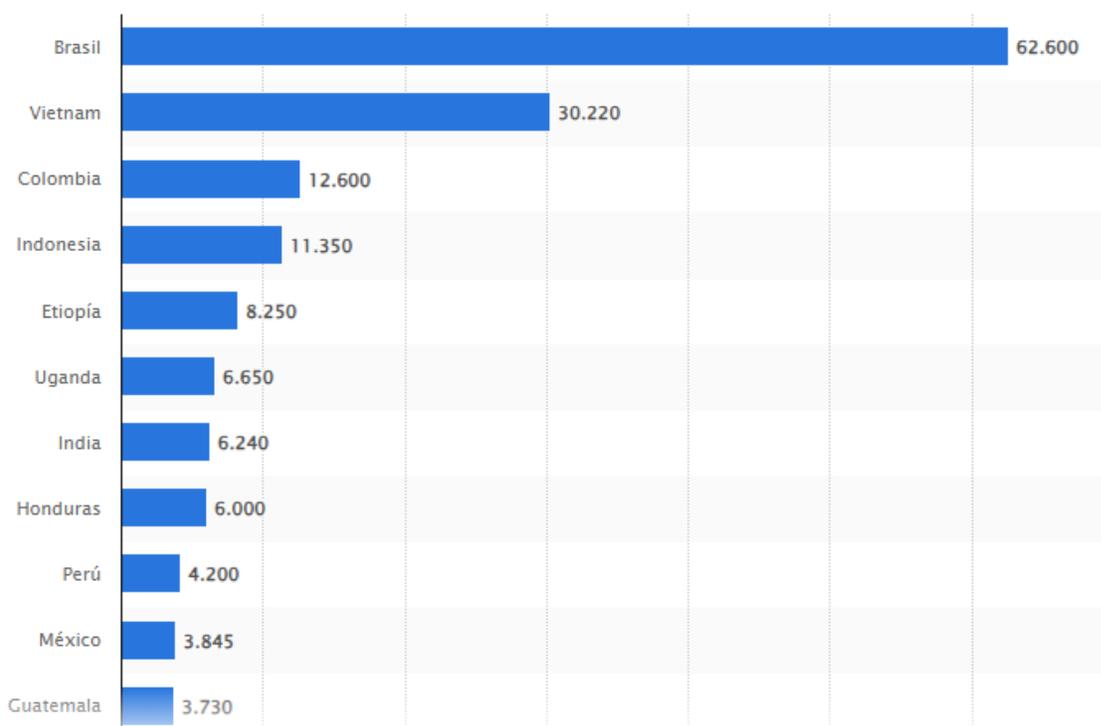
La Organización Internacional del Café publica anualmente un listado con los productores de café del mundo. Brasil, Colombia y Vietnam encabezan la lista y México es el 11º productor mundial. Actualmente, el café representa el 0.66% del PIB agrícola nacional y el 1.34% de la producción de bienes agroindustriales.

En México, el café es un cultivo estratégico; su producción emplea a más de 500 mil productores de 15 entidades federativas y 480 municipios. La producción mexicana de café cereza fue en promedio de 899 mil toneladas en el periodo 2017-2021; Chiapas es el principal estado productor, aporta el 41 % del volumen nacional, seguido por Veracruz 24% y Puebla 15%.

En base a la certificación DMR-547a “plaguicidas en café” realizado en noviembre de 2017, es preciso realizar un monitoreo para la recertificación de dichos materiales de referencia.

Figura 4

Principales productores de café en el mundo



Nota: Representación en toneladas métricas

Alrededor de 7.7 millones de toneladas de café se producen a nivel mundial por año **Figura 4**, en una superficie de 10.5 millones de hectáreas en más de 50 países. 85% de café del mundo se produce en Latinoamérica. Brasil es el exportador más grande con 29% de la totalidad de exportación.

Para demostrar que los productos no contengan residuos de plaguicidas por arriba de regulaciones permitidas para las exportaciones es necesario disponer de métodos de cuantificación confiables con alta sensibilidad y precisión, este trabajo se centra en el desarrollo de un material de referencia en plaguicidas en la matriz de cereza de café de acuerdo a los criterios de la norma mexicana NMX-CH-165-INMC-2008 (materiales de referencia-principios generales y estadísticos de certificación) y la norma internacional ISO/Guía 35:2017 Materiales de referencia: Guía para la caracterización y evaluación de la homogeneidad y la estabilidad, para asegurar la confiabilidad de las mediciones y para ser utilizados en la validación de métodos de cuantificación para el análisis de estos, lo que permitirá asegurar la calidad de estos productos como productos de consumo nacional y de exportación.

2.6 PLAGUICIDAS

El código internacional de conducta sobre la distribución y uso de plaguicidas de la "Food and agricultura organization " (FAO) de las Naciones Unidas, establece que un plaguicida es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos.

El termino plaguicida engloba una enorme cantidad de compuestos activos, sustancias inertes de acompañamiento y disolventes que hacen difícil su acotamiento como una familia o tipo de compuestos (Doménech, 2004).

Los plaguicidas se utilizan para proteger los cultivos contra insectos, malas hierbas, hongos y otras plagas, y es de suma importancia saber qué cantidad de ciertos plaguicidas se deben verter sobre los cultivos teniendo en cuenta la inocuidad de dichos alimentos, ya que ello contribuye a una vida, una economía, un planeta y un futuro saludable (Salud O. M., 2022).

Son productos fitosanitarios necesarios para proteger las plantas, prevenir su deterioro y garantizar el abastecimiento de vegetales en la población. Los plaguicidas son

sustancias que pueden ser agentes químicos, biológicos (como virus, bacterias, antimicrobianos, desinfectantes, etc.) o una mezcla de materiales destinados a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Se aplican para eliminar plagas específicas como insectos, roedores, malezas bacterias, patógenos vegetales, moluscos, nematodos, mohos, hongos y cualquier microbio que destruya la propiedad, cause molestias, propague enfermedades o sea vector de enfermedades (Doménech, 2004).

Los residuos de estos plaguicidas pueden acabar en el aire, el suelo, el agua e incluso en el alimento, con nuevos materiales de referencia de plaguicidas se puede supervisar con precisión la calidad del suelo, el agua y los alimentos según las normatividades nacionales e internacionales.

2.6.1 Clasificación de los plaguicidas

Conforme a su toxicidad, los plaguicidas pueden ser extremadamente peligrosos, altamente peligroso, moderadamente peligrosos y ligeramente peligrosos. Según su vida media, pueden ser permanente, persistentes, moderadamente persistentes o no persistentes (Salud O. M., 2022).

De las distintas clasificaciones que se realizan sobre plaguicidas, la de mayor interés sanitario es la correspondiente a su estructura química, ya que está determinada en gran medida su incidencia en el organismo. Existen en el mercado plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretrinas (Doménech, 2004).

- a. **Organoclorados:** contienen una alta estabilidad física y química, insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Se utilizan como insecticidas y herbicidas, los de peor fama por el DDT, un compuesto prohibido en gran parte del planeta.
- b. **Organofosforados:** son esteres aminos o tioles derivados de los ácidos fosfóricos, fosfónicos y fosfortóicos, se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrolisis. Estos son fundamentalmente insecticidas, presentan una toxicidad más selectiva y son menos persistentes, los más conocidos son paratión, melatión, fenitrotión y diazinón.

- c. **Carbamatos:** utilizados como insecticidas domésticos y agrícolas, herbicidas y fungicidas.
- d. **Piretrinas:** son los menos utilizados en el país, uno de sus compuestos es el pelitre, posiblemente el primer insecticida de la historia.

Para dicho estudio se realiza la caracterización de MRC en plaguicidas, para lo cual se trabaja con dos tipos de plaguicidas aplicados en cereza de café, y otros dos tipos diferentes de plaguicidas para el aguacate, estos plaguicidas son de la familia de los organofosforados, ya que presenta una toxicidad más selectiva y son menos persistentes.

Para el caso de las cerezas de café se utiliza el diazinón, un plaguicida usado para controlar insectos en el suelo, en plantas ornamentales y en cosechas de frutas y hortalizas, que actúa por contacto, estomacal y respiratoria de amplio espectro de acción sobre insectos masticadores, minadores y chupadores (Agroquímicos, 2023).

Por otro lado, los monocrotofos son sólidos cristalinos de color marrón rojizo (parecido al azúcar o a la arena) con un olor suave, que se usa como insecticida y tiene una actividad sobresaliente para el control de gusanos y picudos, su ingrediente activo penetra el tejido del insecto rápidamente ya que actúa por ingestión y contacto (SIFATEC, 2020).

El acefato es un plaguicida foliar organofosforado, penetrante, con actividad por ingestión y contacto y cierta acción sistemática, se absorbe fácilmente por las raíces y se transloca a toda la planta, se usa para el control de insectos masticadores y chupadores en arroz, algodón, coles, macadamia, ornamentales, papa, tomate y tabaco. Para el uso en este proyecto se utiliza en aguacate (Rico, 2023).

Los plaguicidas del estudio en cuestión son los que se presentan en la **Tabla 2**, incluyendo los límites máximos permisibles de dichos plaguicidas, en México y sus requerimientos nacionales.

Tabla 2*LMR para plaguicidas de estudio*

Número	Plaguicidas	Límite máximo de residuos (mg/Kg) México	Límite máximo de residuos (mg/Kg) USA e-CFR	JFCFR (mg/Kg) Japón	FAO/OMS MLRS (mg/Kg)
1	Dimetoato	No autorizado	2	1	0.3
2	Diazinón	0.7	0.75	0.1	0.5
3	Monocrotofos	1	2	1	1
4	Acefato	No autorizado	0.6	0.4	0.2
5	Metamidofos	No autorizado	2	0.01	1

CFR-Code of Federal Regulation of United States

JFCRF- Japan Food Code of Federal Regulation

FAO- Food and Agriculture Organization of the United States

OMS- Organización Mundial de la Salud

LMR para los plaguicidas de estudio

2.6.2 Uso y control de plaguicidas en México

En México, la Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional (DGICURG), que pertenece al Instituto Nacional de Ecología (INE), difunde información sobre el manejo adecuado de las sustancias químicas, participa en la ejecución de estrategias de monitoreo y evaluación ambiental, desarrolla inventarios sobre plaguicidas y sustancias tóxicas y genera estrategias de investigación sobre comunicación de riesgos. Esta dirección, mediante la Investigación sobre sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos y el Sistema de Consulta de Plaguicidas, enlista los plaguicidas permitidos, prohibidos y restringidos.

Por otra parte, la comisión intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) apoya sus acciones en la ley general de salud y en la ley federal de sanidad vegetal para el manejo adecuado de plaguicidas y fertilizantes en la agricultura y medidas fitosanitarias. En 2004 la

CICOPLAFEST actualizó el catálogo oficial de plaguicidas que originalmente se elaboró en 1998. Los únicos plaguicidas cuya importación, comercialización y uso están permitidos en México, son los que han sido registrados por la CICOPLAFEST.

El catálogo incluye hojas de datos de los plaguicidas autorizados en México. Establece la toxicidad de los plaguicidas calculando la dosis letal 50 (DL50), que es definida como la cantidad mínima de una sustancia hoy que es capaz de matar al 50% de una población de animales de prueba. Los resultados de (DL50) obtenidos para un determinado plaguicida hoy se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de la toxicidad. El catálogo no incluye límites máximos residuales (LMRs).

Hoy es importante señalar, que aun cuando los plaguicidas hayan sido utilizados correctamente, hoy es probable que la concentración de residuos en los alimentos se incremente debido al uso de agua de riego y tierras de cultivo contaminadas, o aumentar durante la comercialización al estar en contacto con alimentos con residuos en concentraciones altas.

2.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Para realizar la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos, se han implementado técnicas, tales como: extracción sólido-líquido o líquido-líquido, QuEChERS, extracción con fluidos supercríticos, extracción con líquidos presurizados, extracción asistida con microondas, extracción en fase sólida y micro extracción en fase de salida. Cualquier técnica de extracción a emplear en el análisis de residuos de hola plaguicidas en alimentos debe maximizar la recuperación de los animalitos y minimizar las interferencias.

2.7.1 Sistema de extracción en fase sólida dispersa

El método QuEChERS es un sistema de extracción en fase sólida dispersa que implica 2 etapas fundamentales, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida de espera (López, 2021).

En la primera etapa se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, hoy el cloruro sódico, el citrato trifásico de sodio dihidratado y citrato de sodio dibásico sesquihidratado (FAO/OMAS, 2017) . La función de cada una de estas sales en la etapa de destrucción es diferente.

- a. **Sulfato de magnesio ($MgSO_4$):** mejora la recuperación del analito al facilitar la participación de los pesticidas en la fase orgánica (acetonitrilo) hoy gracias a que retiene agua.
- b. **Cloruro sódico ($NaCl$):** ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.
- c. **Acetato de sodio:** ayuda a la regulación del PH
- d. **Sales de citrato:** se emplean para ajustar el PH a valores de 5.5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La selección de las sales a emplear va a depender de los compuestos que se desean analizar y el tipo de protocolo de análisis a utilizar el método original utiliza sulfato de magnesio y cloruro de sodio.

La segunda etapa de este procedimiento corresponde a una limpieza del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersa. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los componentes presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos. Las sales y solventes empleados en esta fase son:

- a. **Sulfato de magnesio ($MgSO_4$):** elimina el exceso de agua residual
- b. **Amina primaria/secundaria (PSA):** elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- c. **Sorbente C_{18} :** elimina las grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra
- d. **Carbono negro grafitado (GBC):** elimina los pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides, sin afectar a los compuestos plantares.

La selección de la fase sólida dispersa va a depender del tipo de alimento que es analizado y por lo tanto existen diferentes protocolos de clean up para:

- a. Hoy frutas y verduras en general
- b. Frutas y verduras con grasas y ceras
- c. Frutas y verduras pigmentadas (vegetales verdes, zanahorias, etc.)
- d. Hoy frutas y verduras altamente pigmentadas
- e. Frutas y verduras con pigmentos y grasas

Después del procedimiento de limpieza se lleva a cabo una centrifugación y el extracto está listo para ser directamente analizado o sometido a evaporación y recomposición en el disolvente apropiado para su análisis

2.7.2 Estándar interno

El uso de estándares internos adecuados es una buena práctica analítica para mejorar la precisión y la veracidad. En el método QuECERS, el estándar interno se adiciona a la muestra junto después del solvente de extracción para el control volumétrico de todo el proceso analítico. Se recomienda esto porque la señal de normalización del estándar interno puede corregir errores y fluctuaciones volumétricas cuando se trata de la adición del disolvente de extracción a la muestra o el volumen inyectado en la etapa determinante. Un estándar interno adecuado debe tener las siguientes cualidades (Uribe, 2015).

- a. Muy buena estabilidad y recuperación independientemente del PH de la matriz, el contenido de grasa, hola opción de limpieza (por ejemplo, el lujoso de BC).
- b. Que no esté presente como un residuo en ninguna muestra.
- c. Disponible como material puro a precio razonable
- d. Que presente bien los animalitos en el sistema cromato gráfico dado. Por ejemplo, para el estudio de cereza de café el “dimetoato” se usará como estándar interno para plaguicidas recomendado para controlar todo el proceso analítico.

2.7.3 Identificación de compuestos

La última etapa en el procedimiento analítico es la identificación de los compuestos y su determinación cualitativa usando instrumentación apropiada. Las técnicas usuales para determinaciones finales de plaguicidas incluyen la cromatografía de gases con diferentes detectores selectivos y la espectrometría de masas tándem acoplada a sistemas de cromatografía tales como CG-MS/MS.

Hoy durante las últimas décadas los instrumentos de CG/MS principalmente en un solo cuadro polo MS, hola trampa de iones y más recientemente también en triple cuadro polo MS/MS hoy se han convertido en herramientas primarias determinantes en la mayoría de los laboratorios de plaguicidas. Han reemplazado al CG con detectores convencionales y ha permitido la identificación y cuantificación simultánea de una gama más amplia de analito susceptibles al CG, hoy independientemente de su composición elemental.

2.7.3.1 Técnicas de separación: Cromatografía

La cromatografía permite separar entre sí los componentes de una sustancia y su gran aplicabilidad se debe a la variedad de condiciones que pueden utilizarse para separar dichos componentes. Se pueden utilizar fases móviles distintas (gases, líquidos o fluidos supercríticos) fases estacionarias distintas (minerales, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos).

La elección de cromatografía de gases respecto a PLC hoy depende de las características fisicoquímicas de los pesticidas. La CG emplea principalmente para plaguicidas que se vaporizan hoy fácilmente sin degradarse, con puntos de ebullición por debajo de los 250 °C y polaridades bajas o intermedias en el análisis.

Actualmente el análisis de plaguicidas mediante GC, involucra el uso de columnas capilares, las cuales poseen diámetros internos menores a 1 mm, paredes generalmente recubiertas de una película de fase estacionaria. El uso de columnas capilares permite una mejor resolución y separación rápida de componentes comparadas con las columnas

empacadas lo que permite realizar más ensayos aumentando el rendimiento de análisis de muestras.

Las columnas capilares empleadas en la GC para el análisis en alimentos habitualmente poseen una fase estacionaria generalmente de polímeros de polisiloxano o polietilenlicoles. Debido a que los plaguicidas en la muestra son de polaridad baja, las columnas capilares son de polaridad baja y de superficies inertes. Las columnas capilares FactorFour de Varían Inc. y las de Agilent Technologies son las más utilizadas en los análisis de residuos de plaguicidas.

Generalmente la muestra a inyectar se encuentra en estado sólido o líquido y debe ser vaporizada de alguna manera. La temperatura óptima del inyector se determina experimentalmente y en general es igual o superior a la temperatura máxima alcanzada por la columna durante la separación.

Inyectar una muestra en una columna capilar de diámetro inferior a 1 mm es complicado porque la muestra debe ser pequeña para no causar una sobrecarga de la fase estacionaria. Para mantener la cantidad de muestra en el intervalo correcto se emplea el inyector Split/splitless, que reduce la cantidad de muestra que llega a la cabeza de la columna capilar. Las muestras de concentración baja de analito se inyectan por el método splitless y se arrastra mediante el gas acarreador en la columna. Por otro lado, hoy si se utiliza el método Split, el gas acarreador fluye continuamente, el flujo excesivo se expulsa hoy sólo una fracción de la muestra llega a la columna.

Después que la mezcla ha sido separada en él cromatógrafos de gases, cada uno de los componentes se identifica por un detector. Para detectar los componentes separados se miden los cambios que se producen en una serie de propiedades físicas o químicas diferentes. Como la conducción de corriente eléctrica, absorción de luz y habilidad para conducir el calor. Hoy el detector registro de los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasó por él. Hoy a medida que estos cambios son registrados y reproducidos en forma de gráfica o bien almacenados en la computadora y posteriormente reproducidos en forma de gráfica se observa la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo (cromatograma).

2.7.3.2 Técnicas de identificación: Detectores

Existe una gran variedad de detectores que pueden estar acoplados al cromatógrafo de gases y permiten identificar los compuestos de interés que se encuentran en la muestra. En la Tabla 2 se enlistan algunos detectores utilizados, con un resumen de sus características. Los detectores más sensibles han permitido hoy el desarrollo de métodos de análisis de trazas. La GC puede usarse para cuantificar niveles de ppm (Uribe, 2015).

Tabla 3

Propiedades de detectores para GC

Tipo	Características
Conductividad térmica	<i>Detector universal.</i> Mide cambios en la conducción del calor. Se emplea para identificar hidrocarburos, medir hidrogeno o aire en CO ₂
Ionización de flama	<i>Detector universal.</i> Mide corrientes iónicas de pirolisis. Solo para hidrocarburos, pues permite detectar los iones de C que se forman durante la combustión a temperatura alta. La mayor desventaja es que no puede emplearse para detectar O ₂ , N ₂ y CO ₂ .
Captura de electrones	<i>Detector selectivo para compuestos que contienen átomos con afinidad electrónica elevada.</i> Se emplea para identificar plaguicidas organoclorados. Empleado en análisis de frutas, vegetales, jugos, cereales, especias, nueces, carne, pescado, queso, entre otros. Proveen resultados ambiguos y está sujeto a interferencias por la matriz
Fotométrico de llama y nitrógeno- fosforo	<i>Detector selectivo para compuestos que contienen S o P y N o P, respectivamente.</i> Detectan plaguicidas organofosforados. Proveen resultados ambiguos. Están sujetos a interferencias por la matriz

Detector Hall	Detector específico para compuestos que contienen un halógeno, S o N.
Espectrometría me masa (MS)	<p>Detector universal.</p> <p>a. Un analizador de masa: honestamente sensible para la elucidación estructural de compuestos químicos. Hoy herramienta útil debido a la disponibilidad de bibliotecas con espectros de pesticidas. Popular en el análisis de contaminantes en alimentos.</p> <p>b. Captura de iones o trampa de iones: adecuada cuando se emplea la extracción con fluidos supercríticos. Ahorra tiempo, esfuerzo y dinero debido a su habilidad para cuantificar y confirmar una variedad hoy de animalitos a concentraciones de trazas en una matriz compleja con una simple inyección permite realizar masa en cascada multietapa.</p> <p>c. Triple cuadrupolo (QqQ): permite realizar masa/masa o en cascada (MS/MS). Selectividad y sensibilidad en ppm y ppt de plaguicidas en muestras complejas como frutas y vegetales. Permite detallar la información estructural de un ión fragmento o la identificación de compuestos encontrados en estas mezclas complejas. El incremento de selectividad de esta técnica reduce la influencia de la matriz y también de los límites de detección bajos</p>

2.8 INOCUIDAD ALIMENTARIA

De acuerdo con la definición de la Organización Panamericana de la Salud y lo establecido por el Codex Alimentarius es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine (Salud O. P., 2022).

Garantizar la inocuidad alimentaria es un proceso complejo que empieza en la explotación agrícola y termina con el consumidor. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) es la única organización internacional que supervisa todos los aspectos de la cadena alimentaria, lo que permite ofrecer una visión única (FAO, Inocuidad y calidad de alimentos, 2023).

Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza biológica, química o física y con frecuencia son invisibles a nuestros ojos. Se tratan de bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas perjudiciales (como residuos de plaguicidas). Solo los alimentos inocuos satisfacen las necesidades alimentarias y contribuyen a que todas las personas tengan una vida activa y saludable. No existe seguridad alimentaria sin inocuidad en los alimentos (Argentina.gob.ar, s.f.).

2.8.1 Laboratorios de inocuidad

Con la finalidad de preservar los alimentos de origen vegetal, animal, acuícola y pesquero del país, libres de contaminantes y patógenos, a través de técnicas específicas, la institución favorece al productor mexicano al proporcionar herramientas de sanidad para que tenga ventaja competitiva y pueda posicionarse con éxito en el mercado nacional e internacional al cumplir con los parámetros de sanidad establecidos por las autoridades sanitarias.

Con lo anterior se promueve la apertura de nuevos mercados, así como de los destinos y de los productos para favorecer el incremento de la productividad en las regiones del país.

El área de análisis de plaguicidas y contaminantes atiende las necesidades de análisis de muestras de interés agroalimentario utilizando tecnología confiable y oportuna que permite la emisión de resultados de vanguardia.

2.9 SEGURIDAD ALIMENTARIA

La seguridad alimentaria se describe y desglosa en la ISO 22000 donde especifica los requisitos que debe cumplir un sistema de gestión para asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria desde el punto de venta hasta el consumo final; los objetivos de esta norma son reforzar la seguridad alimentaria, fomentar la cooperación entre todas las partes involucradas en la cadena alimentaria, los gobiernos nacionales y organismos transnacionales, asegurar protección para el consumidor y fortalecer su confianza, establecer requisitos de referencia para los sistemas de gestión de la seguridad alimentaria, así como mejorar el rendimiento de los costes a lo largo de la cadena de suministro alimentaria (Rozo, 2020).

Además de los organismos nacionales de normalización, las ISO, en México se cuenta con las normas oficiales mexicanas, por ejemplo, la NOM-AA-103-1988 sobre plaguicidas- determinación de residuos en alimentos-método de toma de muestra. Establece los procedimientos para la toma de muestra representativa de un lote de alimento que sirve para determinar la cantidad de residuos de plaguicidas, así como el tratamiento que debe darse en la muestra para su envío al laboratorio. Se aplica tanto en alimentos elaborados como no elaborados, para consumo humano o animal (AENOR, Seguridad alimentaria: una responsabilidad de todos, 2018).

2.10 LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS (LMR)

Los límites máximos de residuos (LMR) indican la cantidad máxima de residuos de un plaguicida (expresado en mg/kg) en un determinado producto. El concepto de LMR fue introducido en el año 1955 para regular la comercialización de productos con niveles seguros de residuos de plaguicidas, por el Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCRP, por sus siglas en inglés) basados en las recomendaciones de los paneles de expertos de la FAO y OMS, al que llamaron comité mixto “Reunión conjunta sobre residuos de plaguicidas” (JMPPR, 2022).

La JM RP realiza evaluaciones científicas de los residuos de plaguicidas en los alimentos para brindar asesoramiento sobre los niveles aceptables en los alimentos que se mueven en el comercio internacional (Rozo, 2020).

2.11 NORMA ISO 22000 DE SEGURIDAD ALIMENTARIA

La norma UNE-EN ISO 22000:2018 especifica los requisitos que debe cumplir un sistema de gestión para asegurar la inocuidad de los alimentos a lo largo de toda la cadena alimentaria desde el punto de venta hasta el consumo final (AENOR, Norma ISO 22000 de Seguridad Alimentaria, 2023).

Cuatro son las principales líneas en las que se centra esta norma:

- a. Adaptación a la estructura de Alto Nivel:
Es común a las normas de gestión ISO (ISO 9001, ISO 14001, ISO 45001) para facilitar la integración con otros sistemas de gestión.
- b. Nuevo enfoque basado en riesgos en dos niveles:
 1. Riesgos de la organización (finanzas, productividad, partes interesadas)
 2. Riesgos en el ámbito operacional del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control)
- c. Modificación y aclaración de requisitos
Requisitos de comunicación, gestión de emergencias, selección de medidas de control, plan de control de Puntos de Control Críticos y de Programas de Prerrequisitos PPR o validación de las medidas de control.
- d. Ciclo PDCA de mejora continua
Dos ciclos PDCA que funcionan conjuntamente, uno que cubre el sistema de gestión y otro de los principios de APPCC

CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO

3.1 PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA EN MUESTRA 1

3.1.1 Alcance

Las muestras después de ser maniobradas se leerán en el cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas; se cuantificarán por interpolación de curva de calibración el diazinón y monocrotofos, usando dimetoato como estándar interno.

3.1.2 Propósito

El método se basa en la extracción de los mensurados en la matriz vegetal de coffeea arábica para poder determinar la concentración existente en el material.

3.1.3 Equipo y material

Tabla 4

Equipo utilizado

Instrumento	Marca	Modelo
Cromatógrafo de gases	Bruker	Scion
Espectrómetro de masas	Bruker	SQ
Balanza analítica	Sartorius	ME-235s
Centrifuga	Eppendorf	5804R
Rotavapr	Buchi	R-124
Evaporador de N2	Orgamation A	
Homogeinizador de tejidos	Omni Int.	GLH

Materiales

- a. Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL
- b. Viales de 20 mL
- c. Viales ámbar de 2 mL
- d. Encapsulador manual
- e. Jeringas de 100 μ L
- f. Acro discos de PFTV de 0.2 μ l

3.1.4 Reactivos

Los reactivos y disolventes empleados en el análisis de plaguicidas en *coffea* arábica se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5

Características de los reactivos empleados en el análisis de plaguicidas

Disolvente/Reactivo	Pureza (%)	Temperatura rotavapor (°C)	Índice de polaridad
Acetona	99.5	59 (sin vacío)	9.0
Ácido acético	99.7	117 (sin vacío)	9.0
Acetonitrilo	99.9	82 (sin vacío)	5
Cloruro de sodio	99.8	-	-
Amina primaria secundaria (PSA)	99.7	-	-
C18	99.6	-	-
Mg(SO ₄) ₂	99.7	-	-

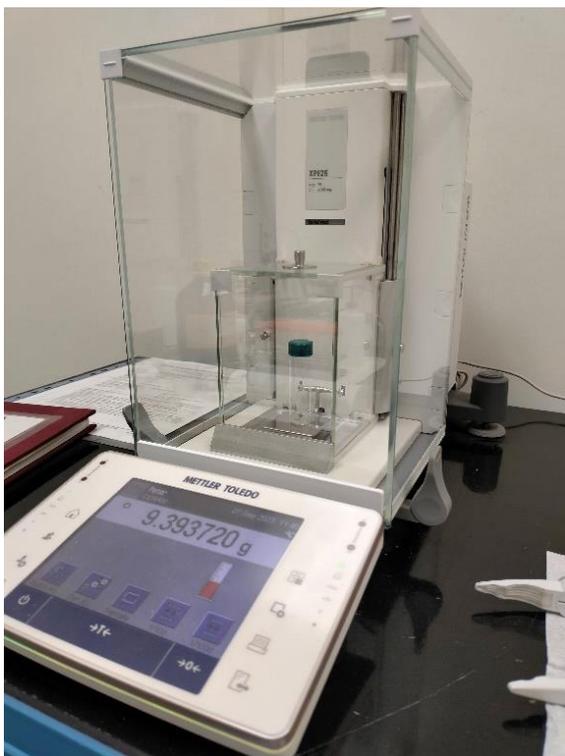
3.1.5 Descripción de las actividades

3.1.5.1 Preparación de soluciones madre

La preparación de las disoluciones madre se preparan para garantizar la precisión y permitir la dilución precisa de la solución cuando sea necesario. Esta ayuda a tener un parámetro de mayor concentración que la necesaria para obtener la concentración final deseada. A continuación, se describe el método de preparación de las soluciones que contienen los niveles con plaguicidas

Figura 5

Balanza analítica



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

- a. Hay que considerar que para el cálculo de la concentración de cada plaguicida es necesario pesar el vial antes de verter la muestra, y pesar nuevamente al aforar con

el acetonitrilo. En ambos casos se debe realizar un pesaje por triplicado en una balanza analítica, **Figura 5**.

- b. Tomar con una espátula una pequeña cantidad del plaguicida “diazinón” e introducirlo en un vial de 8 ml, y aforar con acetonitrilo.
- c. Tomar con una espátula una pequeña cantidad del plaguicida “monocrotofos” e introducirlo en un vial de 8 ml, y aforar con acetonitrilo.
- d. Tomar con una espátula una pequeña cantidad del plaguicida “dimetoato” e introducirlo en un vial de 8 ml, y aforar con acetonitrilo.

Las concentraciones para cada mensurando obtenido a partir de las soluciones madres se reportan en la tabla 6, con estas concentraciones se procede a realizar los cinco niveles para la curva de calibración.

Tabla 6

Concentración de las soluciones madre en mg/kg

Plaguicida	Concentración (mg/kg)
Diazinón 1	312.3833803
Diazinón 2	645.524481
Monocrotofos 1	280.4692736
Monocrotofos 2	331.5447118
Estándar Interno	149.749338

3.1.5.2 Preparación de curva de calibración

Para la realización de la curva de calibración es necesario la preparación de cinco niveles, para ello se utilizó un frasco de blanco de cereza de café del lote de materiales de referencia certificados, **Figura 6**.

Figura 6

Frascos de MRC con blanco y muestra de los plaguicidas en cereza de café



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

3.2.3.1 Procedimiento de preparación en el blanco de cereza de café

Para realizar la preparación de las muestras en el blanco de cereza de café para monitoreo, estas se ambientaron previamente a una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que al ser un material que se conservaba en refrigeración es importante llevarla a condiciones ambientales para poder ser utilizada. Los extractos se obtuvieron con el método “extracción en fase sólida” detallado a continuación:

Se pesó 1 g de cereza café liofilizado en tubos Eppendorf para centrifuga, **Figura 7**, obtenido del frasco “Blanco de cereza de café” en la balanza analítica. Para este paso es importante mencionar que se debe realizar un pesado del tubo vacío, y del tubo con muestra para calcular la concentración exacta de la solución madre que se añadirá.

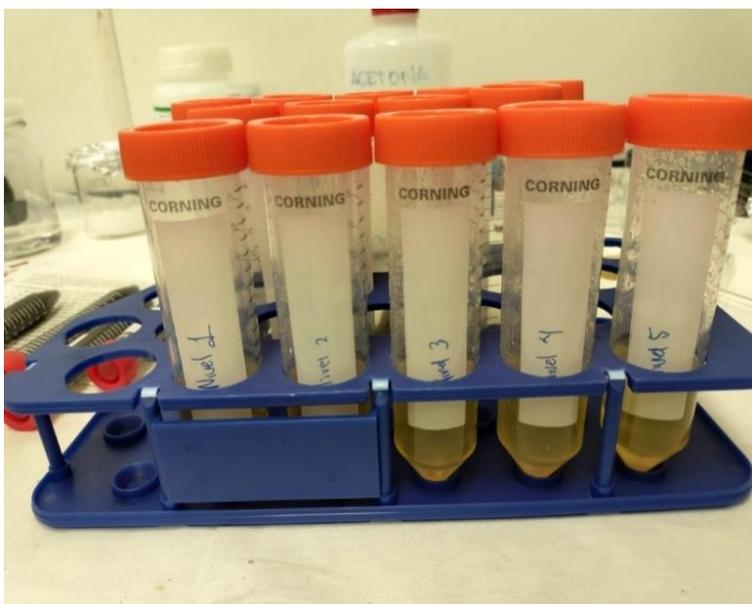
El monitoreo de las condiciones ambientales de temperatura, humedad y presión barométrica al momento de realizar las preparaciones gravimétricas se hizo mediante el sistema de monitoreo ambiental (SMA).

Las condiciones ambientales promedio del laboratorio durante el periodo de realización de los análisis fueron temperatura (20 ± 3) y humedad relativa (45 ± 15) %, la presión barométrica (809-812 HPa).

Se le agregó la cantidad de estándar interno y los plaguicidas de interés calculadas dependiendo de la muestra. Para la primera extracción se le adicionó 15 ml de ácido acético al 1% en acetonitrilo y 5 ml de agua desionizada se dejó reposar por 30 minutos transcurrido el tiempo se agitó con homogeneizador de tejidos por 1 minuto, ver la figura 8.

Figura 7

Tubos Eppendorf con el blanco adicionado



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

La muestra homogeneizada se puso en un sonicador por 10 minutos, la función de un sonicador es poder acelerar la disolución; posteriormente las muestras se llevan a una centrífuga y se configura a 5000 rpm por 15 minutos.

El sobrenadante se colectó en otro tubo que contenía 0.5 g de cloruro de sodio. Los extractos se agitaron por 1 minuto y se dejó reposar para que se separaran las bases se tomó la fase orgánica y se pasó a un tubo de 50 ml con 100 mg de PSA 100 miligramos de

C18 y 300 mg de $Mg(SO_4)_2$ y 100 miligramos de GCB, luego se agitó en el agitador mecánico por 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos hoy el sobrenadante de esto se pasó a un tubo y se concentró usando un rota vapor a una temperatura menor a 40 °C hasta que el producto alcance un valor aproximado de 1 ml.

Figura 8

Centrífuga utilizada para la homogenización de la muestra



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

Posteriormente el producto se filtra utilizando un micro disco de 0.22 micrómetros y una jeringa de plástico, se enjuaga el matraz de bola con acetona por 3 veces y se pasa por el extracto a un tubo de vidrio marcado, posteriormente se concentra mediante evaporación con nitrógeno muy suavemente hasta que el volumen alcance aproximadamente 1 ml. Finalmente se pasa el extracto a un vial ámbar de 1.5 ml, se identifica, como puede verse en la figura 12, y se inyecta en él GC-MS/MS.

Figura 9

Muestra concentrada en el rotavapor



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

Figura 10

Extractos en tubos de vidrio para evaporación con nitrógeno



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

Figura 11

Viales con los 5 niveles



(Fuente: Elaboración propia, 2023)

3.1.6 Cálculos

Las mediciones mostradas a continuación presentan el pesaje realizado por triplicado de cada una de las muestras, para al final obtener un promedio y proceder a los cálculos. En la tabla 8 se resume la concentración de los mensurados.

Tabla 7

Concentración de los plaguicidas en la disolución de cada nivel

Mensurando	N1 (mL)	N2 (mL)	N3 (ml)	N4 (mL)	N5 (mL)
Diazinón	18	24	14	35	20
Monocrotofos	308	347	513	521	719
Dimetoato	256	342	427	513	598

Para el primer experimento, consiste en agregar a un vial las concentraciones descritas en la tabla 7 para cada nivel correspondiente y aforar el vial a 1.5 ml. La razón por la que se indican cinco niveles es porque se necesita detallar una curva de calibración a cinco puntos, sin embargo y como se verá más adelante en el desarrollo del procedimiento

y los resultados, es probable que solo se ocupen tres puntos como máximo para realizar dicha curva.

Es importante mencionar que, para el monitoreo de los plaguicidas en cereza de café, se utiliza un cromatógrafo de gases con espectrometría en masas y por tal razón se busca encontrar picos en iones específicos, la **Tabla 8** describe los iones necesarios para cada mensurando.

Tabla 8

Iones que deben encontrarse en mayor concentración

Diazinón	Monocrotofos	Dimetoato
137	97	87
152	109	93
179	127	125
304	223	229

En la figura 12 se observa el cromatograma de las muestras madre, en donde arroja el tiempo de retención en el que los iones deben aparecer. A partir de los datos obtenidos previamente se realiza la curva de calibración presentada a continuación en las figuras 18 y 19, que nos dará la pauta para realizar las muestras que serán monitoreadas.

En la **Figura 12** se observa con claridad los picos para cada ion, eso indica el tiempo de retención en el aparecen, sin embargo, la intensidad de los picos es muy pequeña para los iones 304 para el diazinón y 87 para el ion del dimetoato que se utiliza como estándar interno. Los niveles realizados para este caso solo sirven como pauta para obtener los picos con mayor intensidad, y como se observa en la figura, la señal es muy pequeña para algunos iones.

Debido a este primer monitoreo se procede a realizar nuevas concentraciones de disoluciones madre para cada uno de los mensurandos; y posteriormente se preparan de nuevo los niveles ahora sobre un frasco del lote de blanco de cereza de café, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 3.

El monitoreo realizado ayudará a determinar la concentración existente de los plaguicidas en cereza de café y de esta manera poder determinar la eficiencia de dicho material para corroborar que el material de referencia certificado se encuentra en óptimas condiciones para seguir funcionando como patrón y por lo tanto continúe a la venta.

Tabla 9

Concentraciones nuevas para el monitoreo

Plaguicida	Concentración (mg/kg)
Diazinón 1	633.125
Monocrotofos 1	775.595
Estándar Interno	1221.841

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se visualizan las nuevas concentraciones con las que se trabajó para las siguientes curvas de calibración. Como ya se mencionó antes, los niveles se prepararon utilizando un blanco y con la metodología antes descrita en el documento. A continuación, se muestran las curvas de calibración para el diazinón y el monocrotofos.

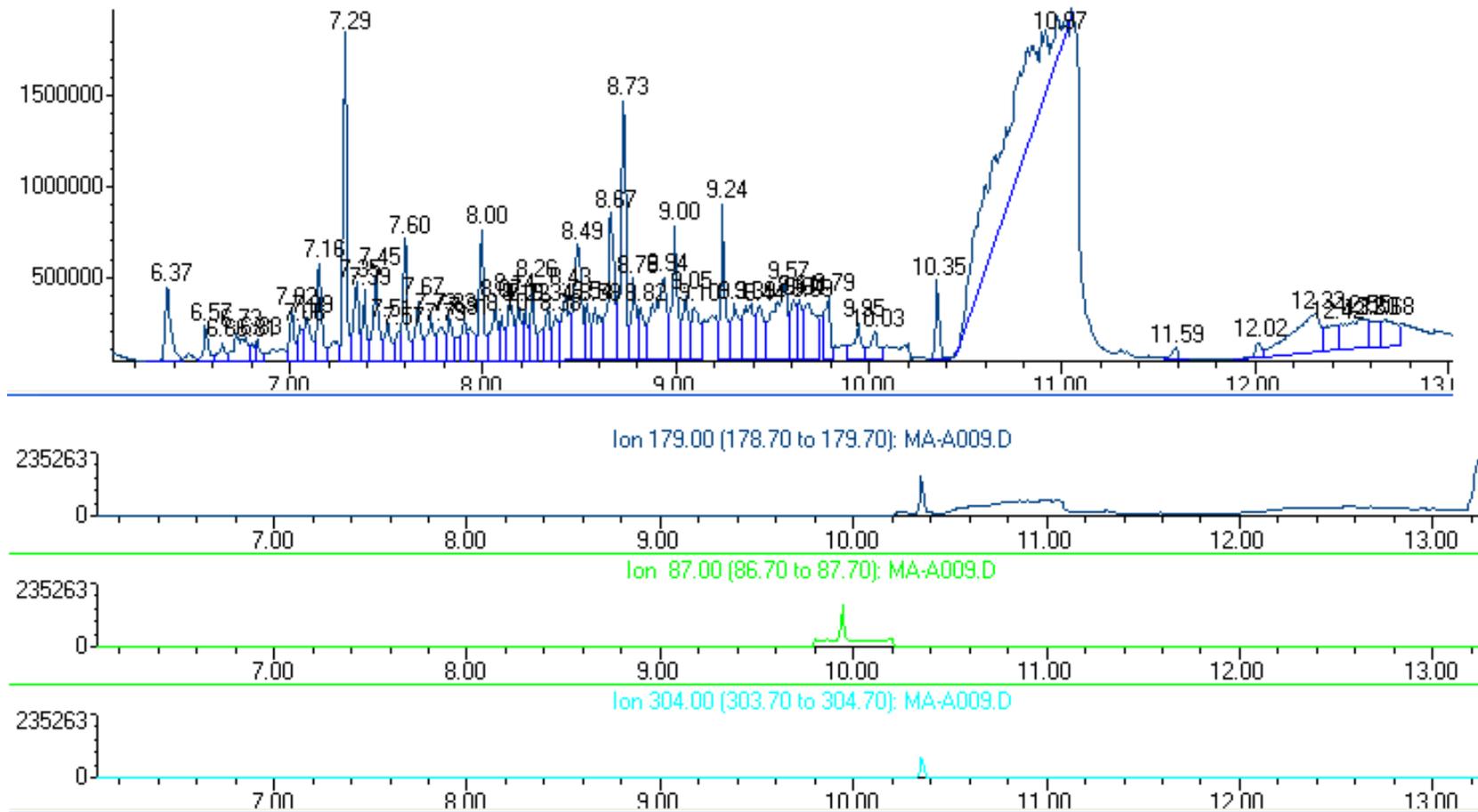
Tabla 10

Datos para grafico de curva de calibración sin estándar interno

Nivel	Concentración	Área
1	1.2308	42458.3333
2	1.1826	50583.3333
3	1.2958	57135.6667
4	1.9324	74187.6667
5	2.0404	102716.6667

Figura 12

Cromatograma de los tiempos de retención de los plaguicidas



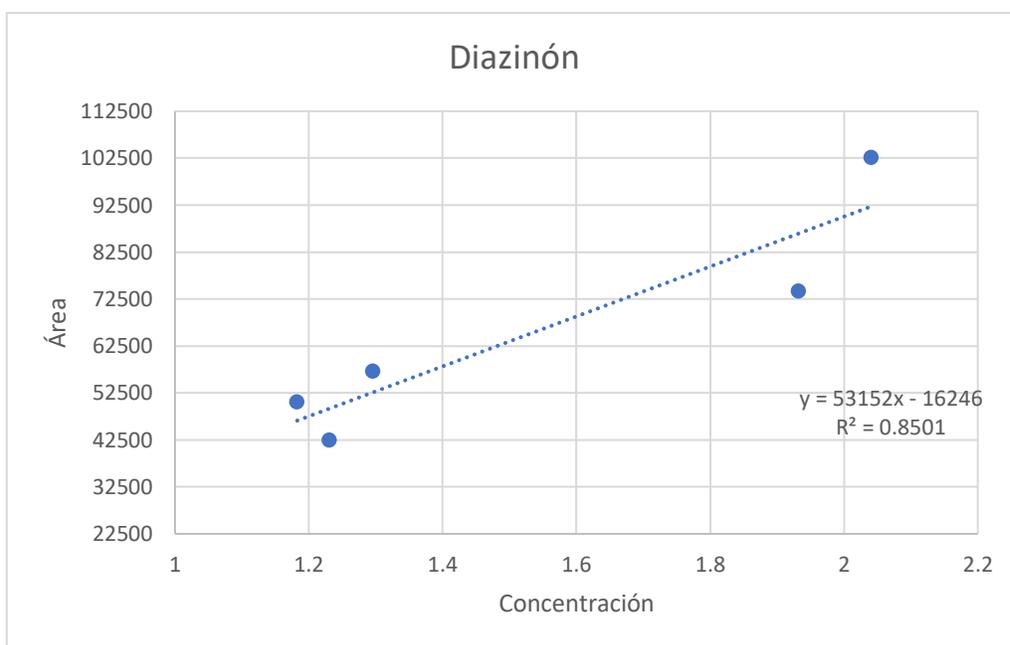
Nota: Se representan los iones 127 para el metamidofos, 87 para el monocrotofos y 304 para el diazinón

Los datos que se obtienen de la curva mostrada en la **Figura 13**, no son favorables, por lo tanto, se hace el ajuste necesario con el estándar interno y se obtiene una gráfica que se muestra en la **Figura 14**.

Aunque el estándar interno indica el ajuste de los analitos, para este caso no fue así, si bien el coeficiente de detección es superior a 0.90 la situación es que con esta grafica no se puede obtener un resultado satisfactorio.

Figura 13

Curva de calibración para el diazinón sin estándar interno



Se muestran las gráficas para las curvas de calibración del monocrotofos sin estándar interno **Figura 15** y con estándar interno **Figura 16**.

Figura 14

Curva de calibración del diazinón con estándar interno

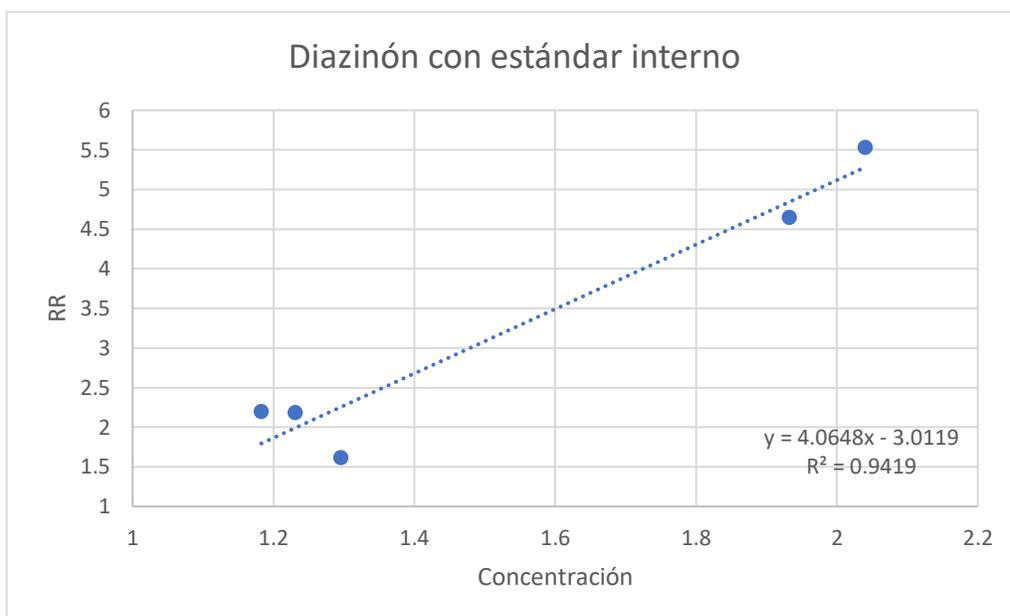
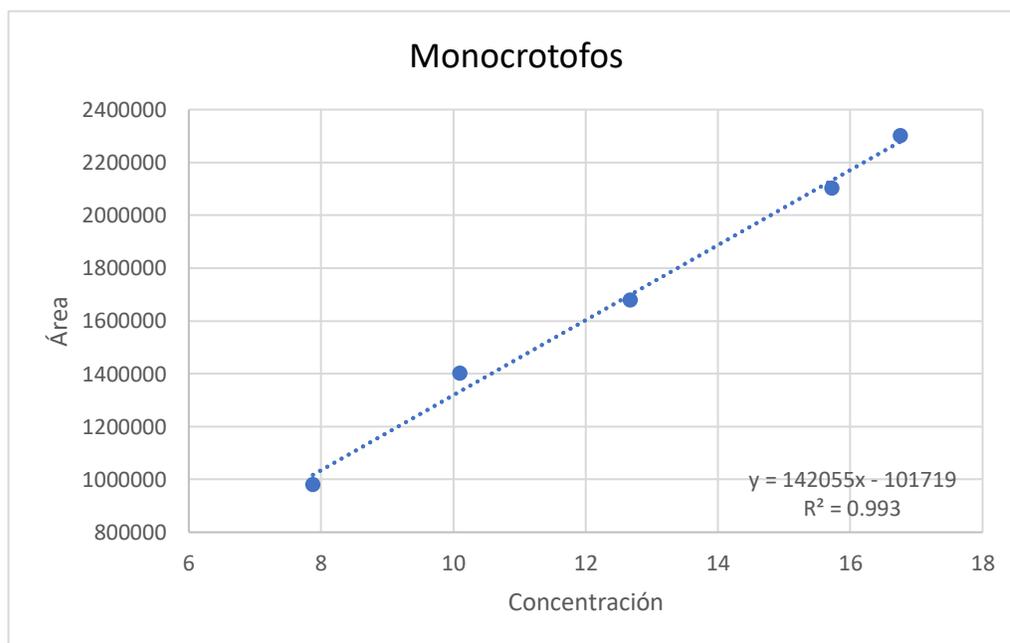


Figura 15

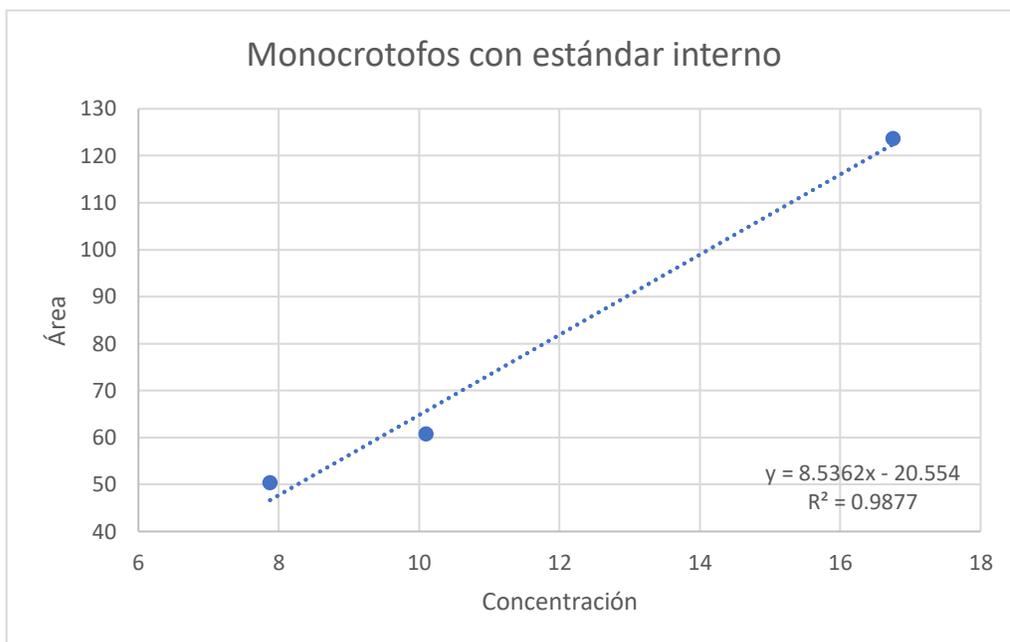
Curva de calibración para el monocrotofos sin estándar interno



Esta curva de calibración sin estándar interno muestra un R cercano a uno, y es realmente imprescindible como es que los datos se acercan más a la linealidad, esto nos podría estar indicando una muy buena señal del mensurando de monocrotofós.

Figura 16

Curva de calibración para el monocrotofós con estándar interno



Para esta nueva grafica se utilizó un ajuste con estándar interno. Se observa que R disminuyó con respecto a los datos de la curva hecha sin estándar interno. Esto indica que posiblemente para este mensurando el dimetoato no esté funcionando de forma tal que ayude a que el resultado sea más favorable.

3.1.7 Resultados

Los resultados obtenidos en estas curvas de calibración señalan muy poco la eficiencia de los plaguicidas, es decir las concentraciones añadidas de cada plaguicida no convergen para un resultado ideal en la curva de calibración, por lo que se procede a realizar la experimentación en muestras añadidas de cereza de café.

A modo de ejemplo, se muestra en la figura 22 el cromatograma para uno de los niveles de este monitoreo, en los que se puede visualizar como ciertos iones ni siquiera son visibles, eso no quiere decir que no estén, simplemente la señal es tan pequeña que no son perceptibles en esta toma. Para poder contemplar los demás cromatogramas ver el anexo 2 de este documento.

De este cromatograma se concluye que la señal que arroja el ion 304 para el plaguicida diazinón, es muy baja, lo que podría estar indicando que el plaguicida se está degradando; se realiza la curva de calibración para el monocrotofos y para el diazinón para visualizar mejor los resultados.

3.1.8 Conclusiones

La fracción de masa de diazinón y monocrotofos en coffea arábica demuestra que los plaguicidas han sufrido degradación con el paso del tiempo, lo que indica que el material de referencia certificado sufre inconvenientes para seguir funcionando como patrón.

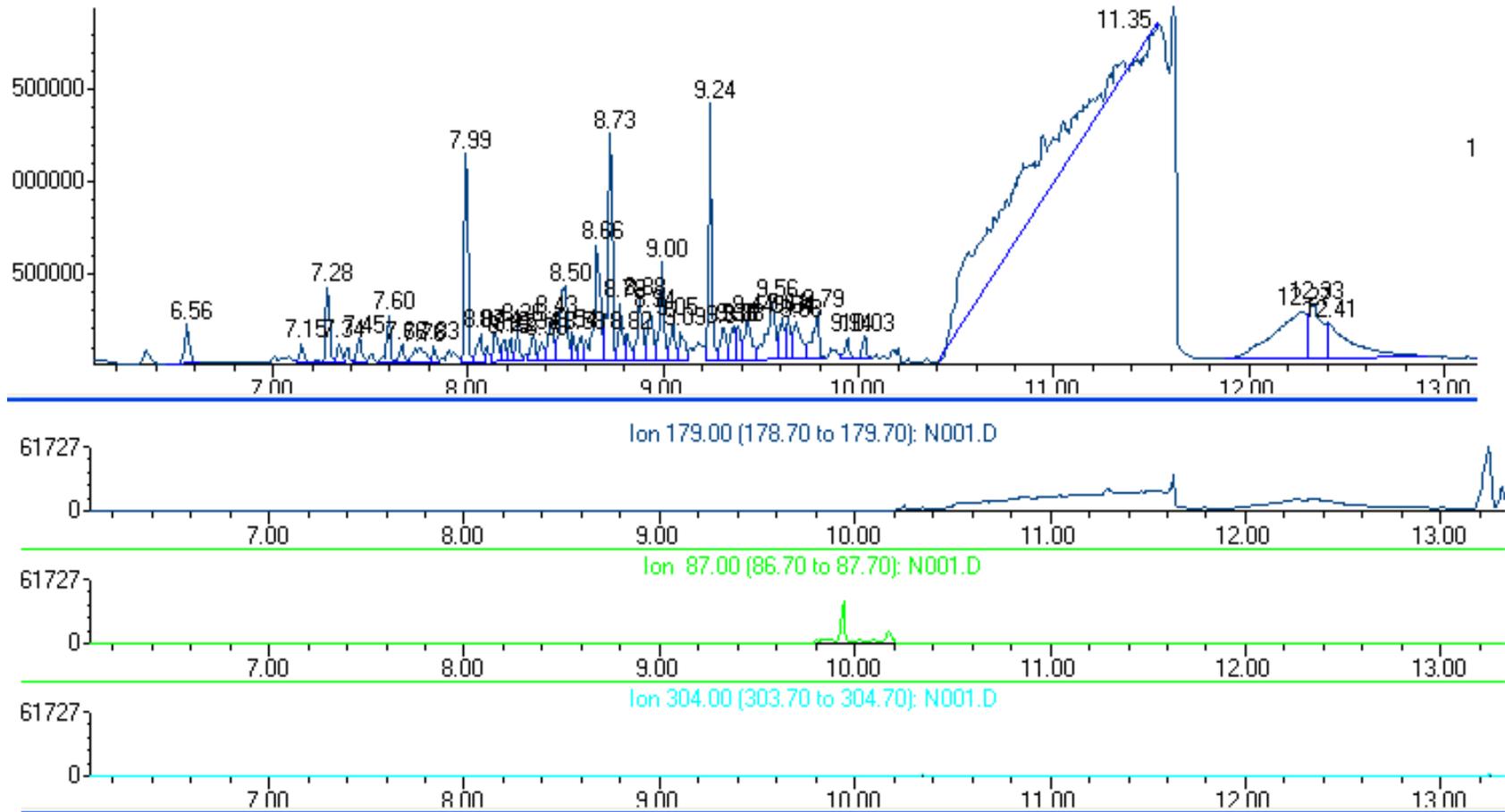
3.1.9 Bibliografía

Procedimiento interno CENAM, Dirección de Análisis Orgánico 600-AC-P.110
“Homogeneidad y estabilidad en los materiales de referencia”

NMX-CH-165-INMC-2008 “Materiales de referencia-Principios generales y estadísticos para certificación.

Figura 17

Nivel 1 del blanco del monitoreo



3.2 PROCEDIMIENTO PARA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REFERENCIA EN MUESTRA 2

3.2.1 Alcance

Las muestras después de ser maniobradas se leerán en el cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas; se cuantificarán por interpolación de curva de calibración el metamidofos y el acefato, usando dimetoato como estándar interno.

3.2.2 Propósito

El método se basa en la extracción de los mensurados en la matriz vegetal de persea americana para poder determinar la concentración existente en el material.

3.2.3 Equipo y material

Tabla 11

Equipo utilizado

Instrumento	Marca	Modelo
Cromatógrafo de gases	Bruker	Scion
Espectrómetro de masas	Bruker	SQ
Balanza analítica	Sartorius	ME-235s
Centrifuga	Eppendorf	5804R
Rotavapor	Buchi	R-124
Evaporador de N2	Orgamation A	
Homogeneizador de tejidos	Omni Int.	GLH

Materiales

- a. Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL
- b. Viales de 20 mL

- c. Viales ámbar de 2 mL
- d. Encapsulador manual
- e. Jeringas de 100 uL
- f. Acrodiscos de PFTV de 0.2 ul
- g. Matraz Kitasato
- h. Embudo
- i. Bomba de vacío

3.2.4 Reactivos

Tabla 12

Reactivos utilizados

Disolvente/Reactivo	Pureza (%)	Temperatura rotavapor (°C)	Índice de polaridad
Acetona	99.5	59 (sin vacío)	9.0
Acetato de etilo	99.8	76 (sin vacío)	8.5
Cloruro de sodio	99.8	-	-
Amina primaria secundaria (PSA)	99.7	-	-
C18	99.6	-	-
Mg(SO ₄) ₂	99.7	-	-

3.2.5 Descripción de las actividades

3.2.5.1 Preparación de niveles a partir de disoluciones madre

Para este paso, también es indispensable la preparación de las disoluciones madre, que como se mencionó con anterioridad, éstas se preparan para garantizar la precisión y permitir la dilución precisa de la solución cuando sea necesario. Para la preparación de las disoluciones madre se sigue el siguiente procedimiento.

Adicionar una pequeña cantidad del plaguicida metamidofos en un recipiente de 8 ml y aforar con acetato de etilo, repetir el procedimiento con el plaguicida de acefato. Se hace nuevamente la aclaración sobre el pesaje de cada vial vacío, así como también al momento de aforar con acetato de etilo. Hacer el pesaje de las disoluciones en una balanza analítica y calcular la concentración.

Tabla 13

Condiciones de los mensurando utilizados para el monitoreo de aguacate

Mensurando	Fracción masa (mg/kg)	Incertidumbre (mg/kg)	Concentración (mg/kg)
Acefato	2.71	0.083	477.91
Metamidofos	4.141	0.405	449.67

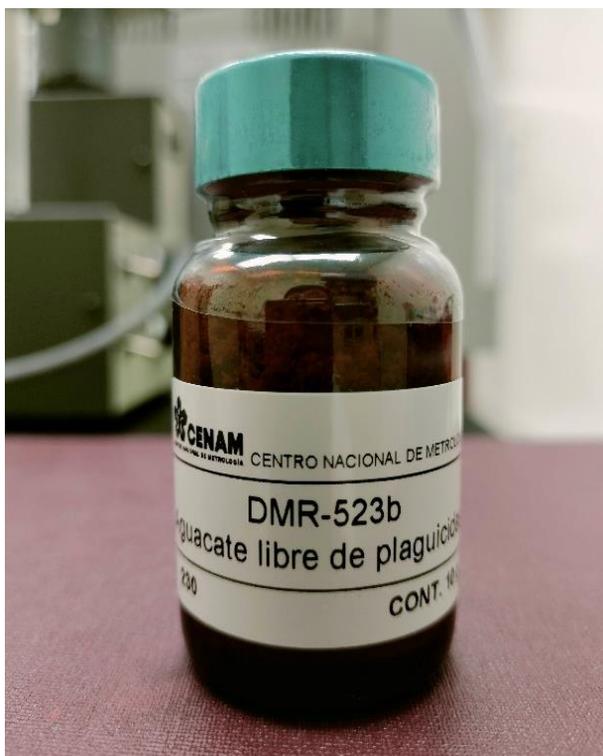
Se realizó la preparación de 5 niveles para obtener 5 puntos en la curva de calibración. Se procedió a calcular la concentración necesaria para cada nivel, respecto a la concentración de la dilución madre, verificar que la concentración se encuentra en términos de masa, por lo que se hace el cálculo para pasarlo a volumen en ml. Se tomó con una jeringa Gass-tigh la cantidad requerida para cada nivel y se vació en un vial de 1.5 ml y se aforó con acetona. Posteriormente se llevó dichos viales a la lectura en el cromatógrafo.

3.2.5.2 Procedimiento de preparación de blanco en aguacate

La metodología utilizada fue ligeramente modificada de la normativa estándar japonesa. Este método no utiliza agua, con el fin de evitar la degradación del acefato durante el procedimiento de extracción. Para este procedimiento se utilizó un frasco del lote de material de referencia certificado, como se observa en la **Figura 18**.

Figura 18

Frasco de aguacate libre de plaguicidas (blanco)

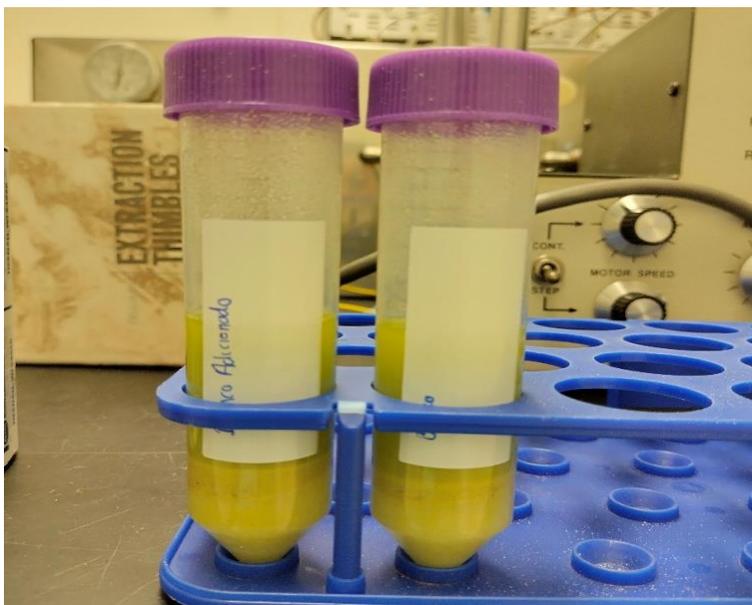


Pesar 1.5 g de aguacate fresco, **Figura 19**, es necesario recordar que el pesaje se debe registrar ya que este paso es primordial para próximos cálculos, se hace el pesaje del vial al estar vacío y después de contener la muestra. Posteriormente añadir el estándar sustituto con 20 ml de acetato de etilo y 10 g de sulfato de sodio anhidrido usando homogeneizador por 5 minutos con el fin de corroborar que todo se haya mezclado. El producto homogeneizado se filtró al vacío, es necesario lavar 3 veces con 10 ml de acetato de etilo cada vez para asegurar una extracción completa.

El extracto de la muestra se concentró en un rotavapor hasta 10 ml. Y para la limpieza, se utiliza un cartucho de sílice de 10 g al que se le debe agregar 1.5 g de sulfato de sodio anhidrido. El cartucho se acondicionó con acetato de etilo y se pasó a través de este.

Figura 19

Muestras de aguacate en tubos Eppendorf



El cartucho se lavó con 70 ml de acetato de etilo y los plaguicidas se eluyeron con 20 ml de acetona. En este paso es primordial saber que la extracción debe ser lenta, ya que esto garantizará que la muestra se conserve y no se pierdan analitos. En un rotavapor rotatorio se concentró la muestra hasta 2 ml, y usando corriente de nitrógeno se ajustó el volumen.

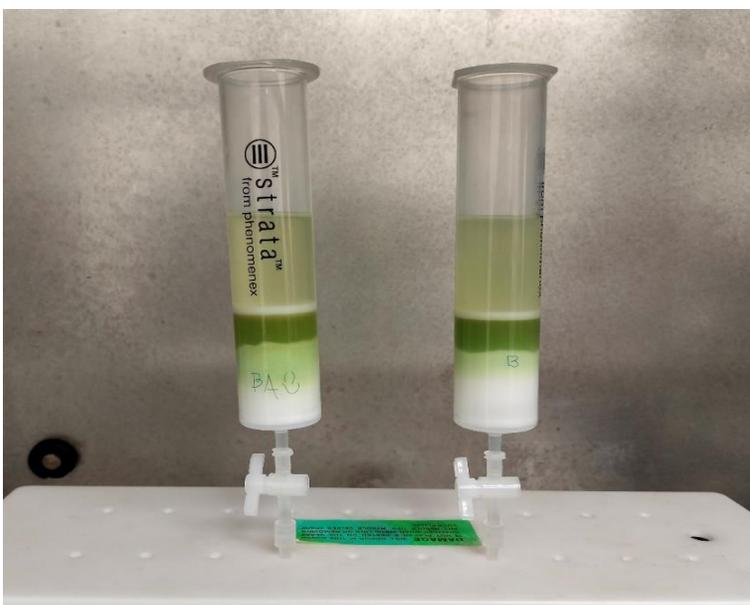
Figura 20

Filtración al vacío



Figura 21

Proceso de extracción mediante los cartuchos de sílice



3.2.6 Cálculos

3.2.6.1 Cálculo de los niveles a partir de disoluciones madre

Conociendo la concentración de las disoluciones madre, se hará una primera prueba de los niveles para ser leídos en el cromatógrafo, lo que consiste en preparar la curva de calibración. De primera estancia se asignan los valores a cinco puntos equidistantes y el cálculo que se sigue para determinar la concentración de cada nivel es mediante la ecuación 1. Se utiliza el valor de 1.5, porque es la capacidad del vial al que se debe aforar. En la tabla 14 se desglosa la concentración para cada nivel respecto al acefato y metamidofos.

Ecuación 1

Cálculo utilizado para determinar la concentración de cada nivel en disoluciones madre de aguacate

$$\text{Concentración } (\mu\text{L}) = \left(\frac{\text{concentración } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) * 1.5}{\text{Concentración solución madre}} \right) * 1000$$

Tabla 14

Concentración para preparar la curva de calibración de acefato

Niveles	Concentración (mg/kg)	Concentración (μl)
1	1.626	5.1035
2	2.168	6.8046
3	2.71	8.5058
4	3.252	10.2069
5	3.794	11.9081

Tabla 15

Concentración para preparar la curva de calibración de metamidofos

Niveles	Concentración (mg/kg)	Concentración (μl)
1	2.4846	7.7983
2	3.3128	10.3978
3	4.141	12.9972
4	4.9692	15.5967
5	5.7974	18.1961

Los viales se llevan a lectura en el cromatógrafo de gases, y la señal que se obtiene para graficar es el área de cada nivel. En la figura 23 se muestra la señal que arroja el cromatógrafo, y se destaca que hay señal en el tiempo de retención de 7.120 para el metamidofos y en 8.453 para el acefato. Para los demás cromatogramas, verificar el anexo 4.

Figura 22

Cromatograma que muestra la señal del nivel 3

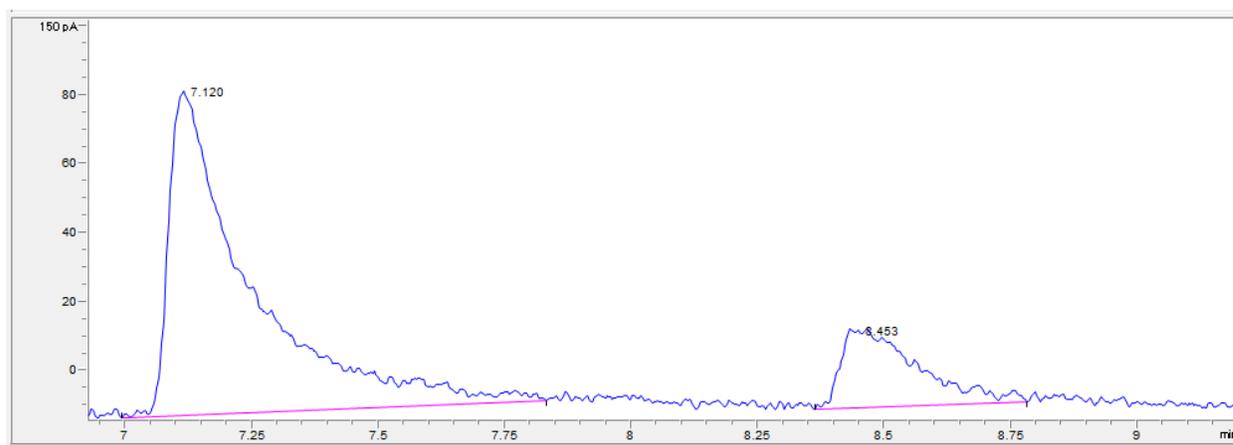


Figura 23

Curva de calibración 1 para el metamidofos

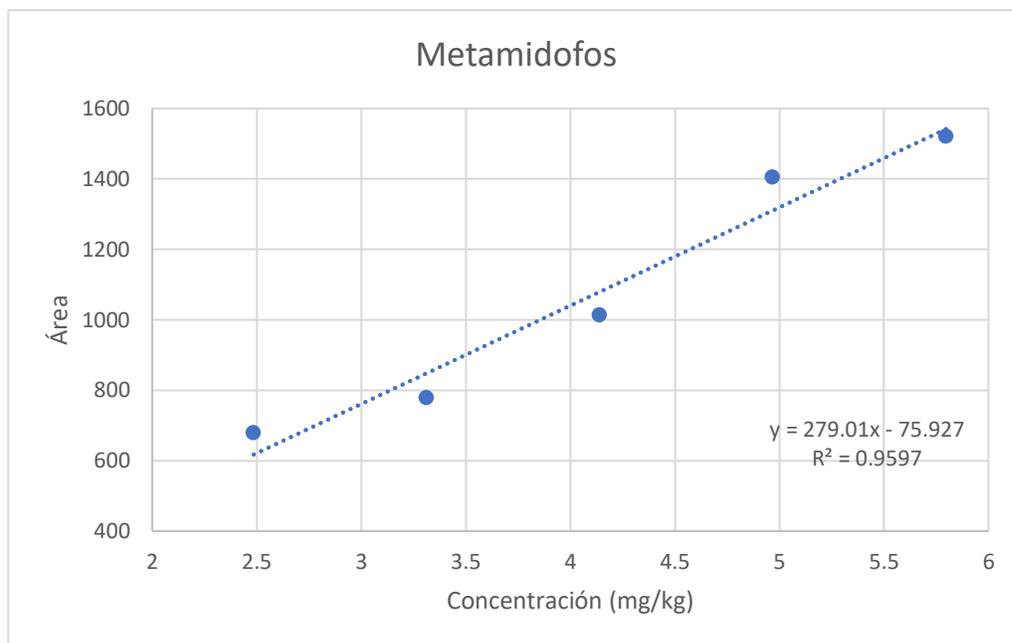
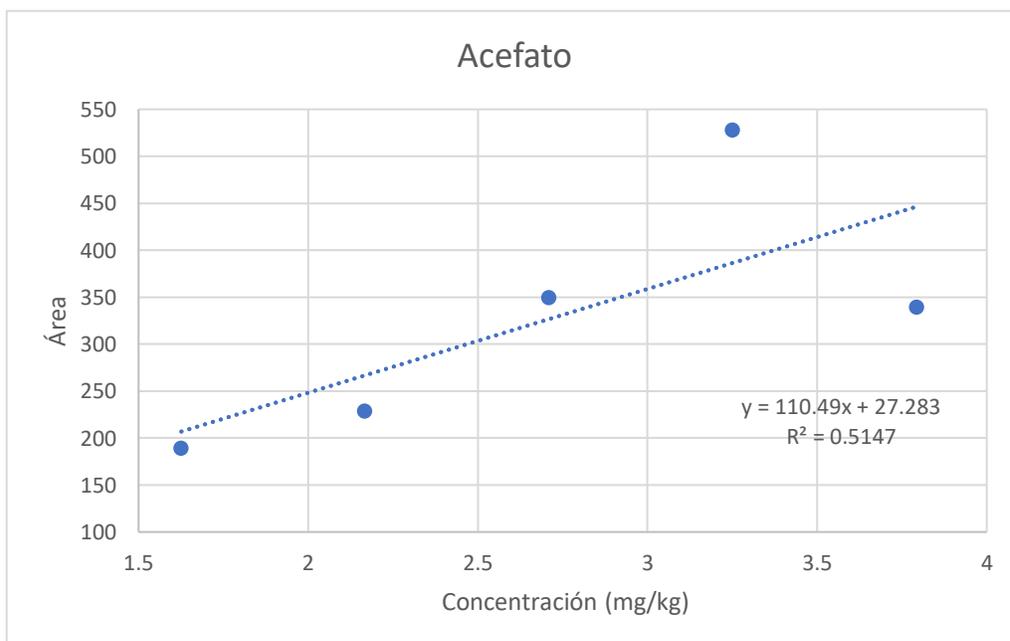


Figura 24

Curva de calibración 1 para el acefato



De acuerdo con los resultados arrojados en la curva de calibración se puede apreciar que los niveles no son lineales, por lo que ahora se procede a realizar otra experimentación.

3.2.6.2 *Calculo de niveles a partir de un blanco*

Para esta situación ahora es importante trabajar en la preparación de los niveles con el blanco de aguacate, esto quiere decir que se llevó a cabo el procedimiento descrito en el capítulo 3 “procedimiento para preparación de blanco en aguacate”. Pero ahora la concentración inicial de la solución madre se trató de llevar a 50 mg/kg considerando que la razón para que los niveles no fueran lineales se debe a que la solución madre estaba muy concentrada. Para lo cual se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Cabe mencionar que también se corrió una muestra,

Para llevar la concentración inicial de la solución madre a 50 mg/kg, se calcula el volumen que se debe extraer del vial, siguiendo la siguiente ecuación 2.

Ecuación 2

Cálculo del volumen para la concentración de la solución madre

$$\frac{\text{concentración esperada} * \text{volumen del vial a utilizar}}{\text{concentración de la disolución madre}}$$

Pesar un vial de 8 ml y agregar el volumen calculado antes, y posteriormente aforar con acetona. Se pesa dicho vial tres veces y se calcula la nueva concentración, en la tabla 16 se puede ver la concentración nueva, de modo que se cumple de cierta forma el llevar a 50 mg/kg las concentraciones iniciales.

Tabla 16

Concentraciones nuevas de los mensurando

Mensurando	Concentración inicial (mg/kg)	Nueva concentración (mg/kg)
Acefato	477.91	49.076

Metamidofos	449.67	52.05
-------------	--------	-------

Tabla 17

Concentraciones para la curva de calibración 2 del acefato

Nivel	Concentración adicionada (µL)	Concentración (mg/kg)
1	66.925	1.568
2	87.438	2.174
3	109.511	2.755
4	127.232	3.394
5	148.432	3.828

Tabla 18

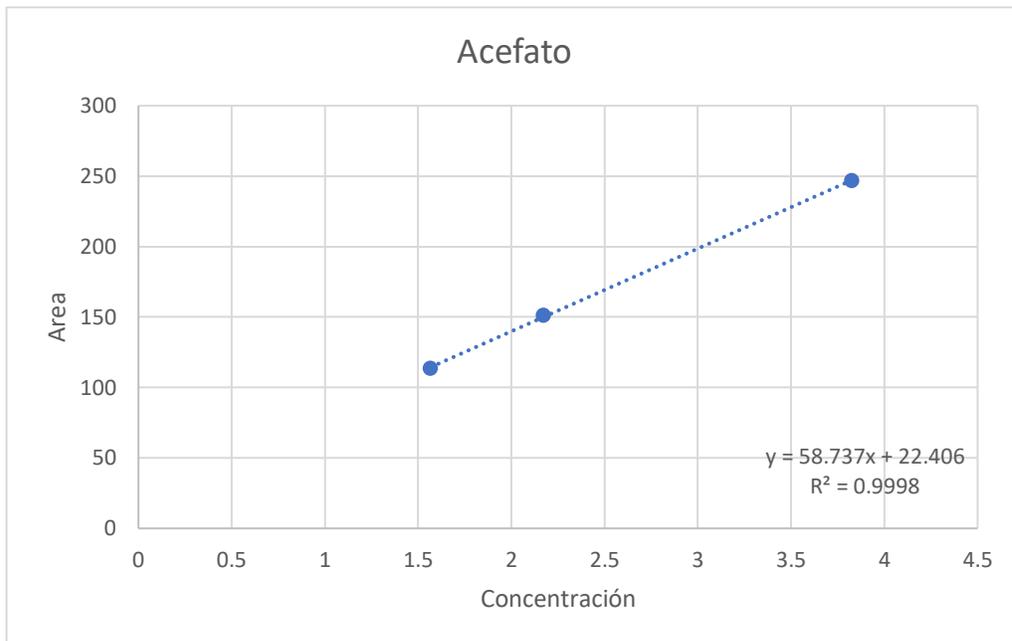
Concentraciones para la curva de calibración del metamidofos

Nivel	Concentración adicionada (µL)	Concentración (mg/kg)
1	96.419	2.439
2	125.973	3.341
3	157.773	4.206
4	183.305	4.864
5	213.848	5.793

En las tablas 17 y 18 se muestran los valores de la concentración para la nueva curva de calibración. Y a continuación en las figuras 26 y 27 se visualizan las curvas realizadas.

Figura 25

Curva de calibración 2 para el acefato



3.2.7 Resultados

La curva de calibración del mensurando de acefato muestra la ecuación de la recta, así como el coeficiente de determinación que para esta curva es superior a 0.99 lo que indica que las variables tienen una relación lineal. A partir de la ecuación de la recta se detalla a continuación el valor concluyente de la concentración final que arroja dicha curva de calibración. Sabiendo que el área relativa de la muestra es de 195.33.

Ecuación 3

Cálculo de la concentración a partir de la recta obtenida para el plaguicida de acefato

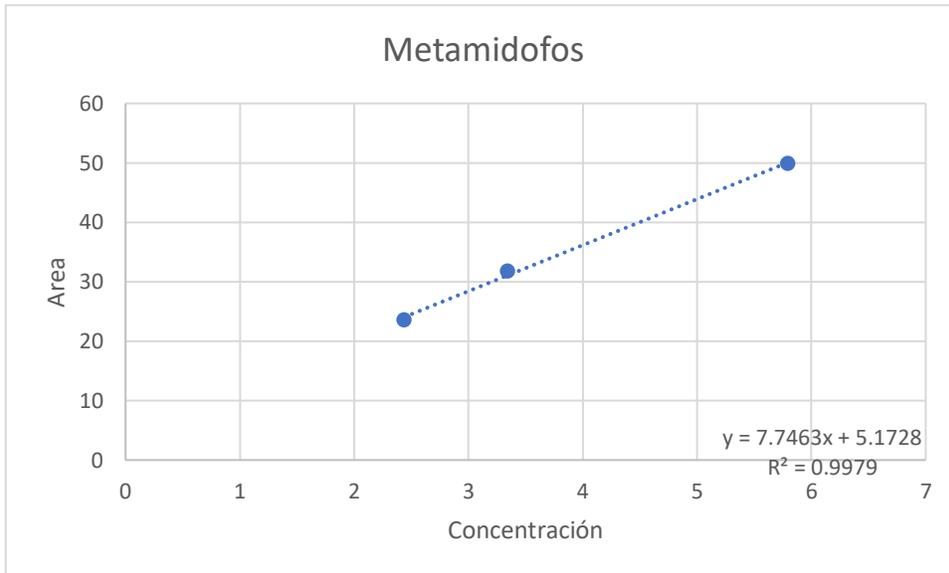
$$C = \frac{\text{Área de la muestra} - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente de la recta}}$$

$$C = \frac{195.33 - 22.406}{5.737} = 2.944$$

Para el mensurando de acefato se espera una concentración igual o cercana a 2.71 mg/kg, para esta curva realizada la concentración es de 2.944 mg/kg.

Figura 26

Curva de calibración 2 para el metamidofos



La curva de calibración del mensurando de metamidofos también muestra la ecuación de la recta, así como el coeficiente de determinación que para esta curva también es superior a 0.99 lo que indica que las variables tienen una relación lineal. A partir de la ecuación de la recta se detalla a continuación el valor concluyente de la concentración final que arroja dicha curva de calibración. Sabiendo que el área relativa de la muestra es de 36.1.

Ecuación 4

Cálculo de la concentración a partir de la recta obtenida para el plaguicida de metamidofos

$$C = \frac{\text{Área de la muestra} - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente de la recta}}$$

$$C = \frac{36.1 - 5.172}{7.7463} = 3.99$$

Para el metamidofos se espera una concentración igual o cercana a 4.141 mg/kg, para esta curva realizada la concentración es de 3.99 mg/kg.

3.2.8 Conclusiones

El valor evaluado se validó con una cantidad de 1 g de muestra, en la que se concluye que el material ha sufrido cierta degradación a lo largo del tiempo tras haber salido a la venta, indicando que los análisis que resulten de él podrían verse afectados o bien no cumplir con las especificaciones avaladas por los laboratorios de ensayo.

3.2.9 Bibliografía

Procedimiento interno CENAM, Dirección de Análisis Orgánico 600-AC-P.110 “Homogeneidad y estabilidad en los materiales de referencia”

Procedimiento interno 600-AC-P.-109 “Estimación de la incertidumbre asociada a la homogeneidad de un candidato a Material de Referencia”

NMX-CH-165-INMC-2008 “Materiales de referencia-Principios generales y estadísticos para certificación.

3.3 EVALUACIÓN O IMPACTO ECONÓMICO

México es uno de los principales exportadores de vegetales, especialmente de especies como persea americana (aguacate) y coffea arábica (cereza de café). Por ejemplo, en 2022, el volumen de producción de aguacate mexicano rebasó los 2.5 millones de toneladas métricas, lo que representa un incremento de más de 100000 toneladas métricas en comparación con la cantidad reportada el año anterior. Por otro lado, según datos del organismo privado, en 2022 México exportó alrededor de 87 mil 970 toneladas de café, lo que implica un incremento de 4.6 por ciento en comparación con las cifras del 2021.

La necesidad de contar con regulaciones de los límites de residuos de plaguicidas es tan importante para preservar su mercado extranjero, debido a ello organismos como

SENASICA, ha solicitado apoyo al Centro Nacional de Metrología mediante la Secretaría de Economía para llevar a cabo los correspondientes análisis en las matrices vegetales correspondientes a persea americana y coffea arábica.

El presente trabajo ayudará al CENAM a otorgar un informe completo de regulación y actualización de los materiales de referencia certificados con los que se cuenta hasta el momento para que continúe su venta en el mercado, y sirva como parámetro para los laboratorios de análisis de plaguicidas para que determinen la cantidad permitida de ciertos plaguicidas en los productos para exportación.

Las personas que se encuentran también beneficiadas con la publicación del informe derivado del análisis obtenido en esta investigación son los agricultores ya que tendrán la certeza de que su producto cuenta con los estándares de calidad más alto para poder ser exportados y comercializados.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una de las mayores dificultades de cuantificar plaguicidas en los productos agrícolas, reside en el proceso de extracción de estos en las diferentes matrices, debido a que estos compuestos se pueden extraer de manera conjunta con los componentes de la matriz y por lo tanto es posible que en el análisis cuantitativo se presenten interferencias. Es por ello que hasta el momento de la redacción de este documento no existe una metodología única de extracción y cuantificación de plaguicidas, ya que éstas dependen de las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto, así como de la matriz en la cual están contenidos.

Para el caso de las extracciones que se realizaron sobre el lote de cereza de café cabe mencionar que el estándar interno fue un referente muy importante para poder obtener estimaciones más cercanas al valor del parámetro de cada mensurando, un hito clave que no se llevó a cabo en las muestras de aguacate, en donde solamente se trabajó con las mensurando exactos.

Se puede concluir que el material analizado en cereza de café y aguacate fue correctamente caracterizado tomando en cuenta las condiciones metodológicas previamente estandarizadas dentro del Centro Nacional de Metrología

El autor recomienda realizar una caracterización con nuevas condiciones de extracción para asegurar que los componentes se encuentran dentro del material analizado, así como también indicar la posible degradación de los materiales analizados dentro de la matriz.

Además, sería importante verificar el método de extracción minuciosamente ya que un paso puede ser clave para los resultados finales.

BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. (2018). *Seguridad alimentaria: una responsabilidad de todos*. Recuperado el 5 de Agosto de 2023, de <https://www.aenor.com/certificacion/alimentacion/seguridad-alimentaria>
- AENOR. (2023). *Norma ISO 22000 de Seguridad Alimentaria*. Recuperado el Septiembre de 2023, de <https://www.aenor.com/certificacion/alimentacion/seguridad-alimentaria>
- Agroquímicos, A. (2023). *Diazinón*. Recuperado el 4 de Agosto de 2023, de <https://www.anajalsa.com.mx/productos/insecticidas/diazinon.php>
- Argentina.gob.ar. (s.f.). *¿Qué es la inocuidad alimentaria?* Recuperado el 5 de Agosto de 2023, de <https://www.argentina.gob.ar/anmat/comunidad/que-es-la-inocuidad-alimentaria>
- Calderón, M. A. (2019). *Ensayo de aptitud para la determinación de plaguicidas en jitomate*. Recuperado el 1 de Agosto de 2023, de <https://www.cenam.mx/servicios/paptitudtecnica/Protocolo/Preprotocolo1520.pdf>
- Calderón, M. A. (2020). *Ensayo de aptitud de determinación cualitativa y cuantitativa de plaguicidas en aguacate liofilizado*. Recuperado el 13 de Agosto de 2023, de <https://www.cenam.mx/servicios/paptitudtecnica/Protocolo/Preprotocolo1755.pdf>
- Campos, J. R. (2018). *Inocuidad en Aguacate*. Guadalajara, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco CIATEJ.
- Doménech, J. (2004). Plaguicidas. *Elsevier*, 3(7), 108-114.
- FAO, O. d. (Mayo de 2022). *Documento de debate sobre el seguimiento de la pureza y la estabilidad del material de referencia certificado de plaguicidas durante el almacenamiento prolongado*. Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-718-53%252FWDs%252Fpr53_17s.pdf
- FAO, O. d. (2023). *Inocuidad y calidad de alimentos*. Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de <https://www.fao.org/food-safety/es/>
- FAO/OMAS. (2017). *Comisión del Codez Alimentarius: Manual de procedimientos*. (Programa conjunto FAO/OMAS Sobre normas alimentarias) Recuperado el 16 de Octubre de 2023, de <https://www.fao.org/home/en/>

- Física, M. d. (27 de Octubre de 2020). *Material de Referencia Certificado (MRC): beneficios para la rutina analítica*. (Controllab) Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de <https://controllab.com/es/material-mrc-beneficios-para-la-rutina-analitica/>
- Jahaziel Días Vallejo, A. B. (2021). Plaguicidas en Alimentos: riesgo a la salud y marco regulatorio en Veracruz, México. *PubMed*, 63(4), 12.
- López, A. F. (2021). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Metrología, C. N. (17 de Septiembre de 2018). *¿Qué son los Materiales de Referencia Certificados?* Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de <https://www.gob.mx/cenam/articulos/que-son-los-materiales-de-referencia-certificados?idiom=es>
- Rico, U. N. (2023). *Manual de plaguicidas de centroamérica*. Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/7-acefato>
- Rozo, M. A. (2020). *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 3 de Agosto de 2023, de <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77984>
- Salud, O. M. (15 de Septiembre de 2022). *Residuos de plaguicidas en alimentos*. Recuperado el 4 de Agosto de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
- Salud, O. P. (2022). *Inocuidad de alimentos*. Recuperado el 4 de Agosto de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/inocuidad-alimentos>
- Servicio Nacional de Sanidad, I. y. (Agosto de 2018). *SAGARPA*. Recuperado el 1 de Agosto de 2023, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/461717/SMEC-PR-DME_Criterios_especif_desemp-Plag-Ver00_2018.pdf
- SIFATEC. (2020). *Monocrotofos 600 LS*. (A Duwest Company) Recuperado el 4 de Agosto de 2023, de <https://sifatec.com.mx/catalogo/monocrotofos-600/>
- Uribe, G. J. (2015). *Desarrollo de la metodología para la obtención de un candidato a material de referencia de plaguicidas en auacate*. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro.

ANEXOS

ANEXO 1. Propiedades de disolventes empleados comúnmente en el análisis de residuos de plaguicidas a 20-25°C

Figura 27

Propiedades de los disolventes utilizados para el proyecto

<i>Disolvente</i>	<i>Polaridad</i>	<i>Solubilidad en agua (%, p/p)</i>	<i>Densidad (g/mL)</i>	<i>Punto de ebullición (°C)</i>
Agua	10.2	-	0.998	100.0
Acetonitrilo	5.8	100	0.786	81.6
Acetona	5.1	100	0.791	56.2
Metanol	5.2	100	0.792	64.6
Etanol	5.2	100	0.789	78.4
Acetato de etilo	4.4	8.7	0.902	77.2
Diclorometano	3.1	1.6	1.33	40.7
Ciclohexano	0.2	0.006	0.789	80.7
Hexano	0.0	0.014	0.660	69.0

Krynitsky, A. J.; Lehotay, S. J., 2003

El punto de visión es una medida de la volatilidad del disolvente y da una idea de cómo el disolvente puede evaporarse en los pasos de concentración. La densidad indica si el solvente formará la capa superior o inferior en los procedimientos de separación. La solubilidad en el agua indica si la separación líquido-líquido puede realizarse para plaguicidas con agua. Es esencial empatar la polaridad del disolvente con la solubilidad del analito.

ANEXO 2. Cromatogramas del monitoreo de cereza de café

Figura 28

Tiempos de retención para el nivel 1 del segundo monitoreo

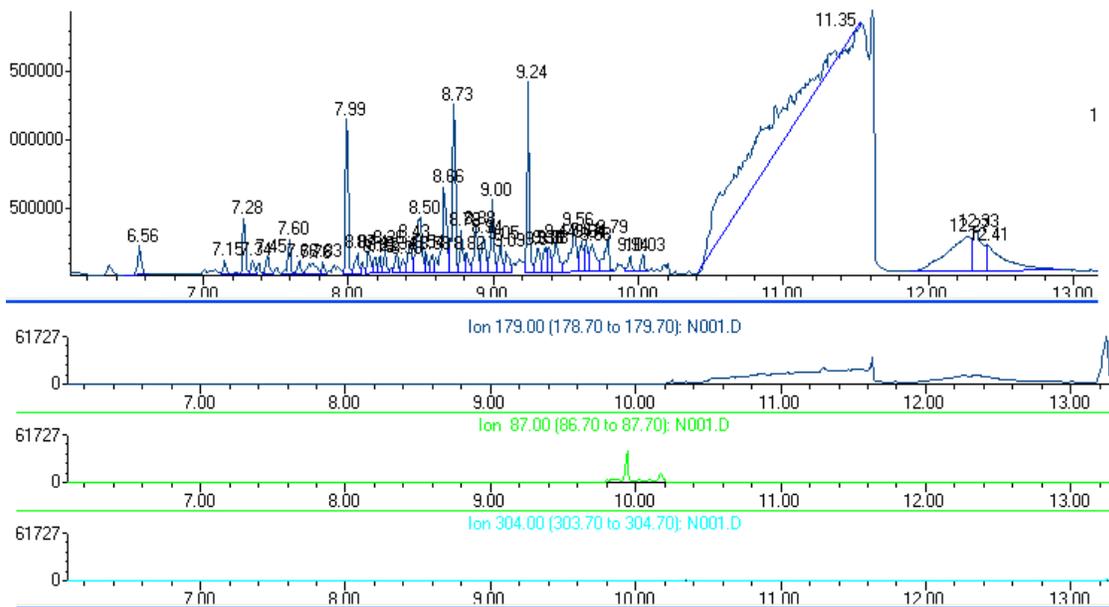


Figura 30

Tiempo de retención para el nivel 3 del segundo monitoreo

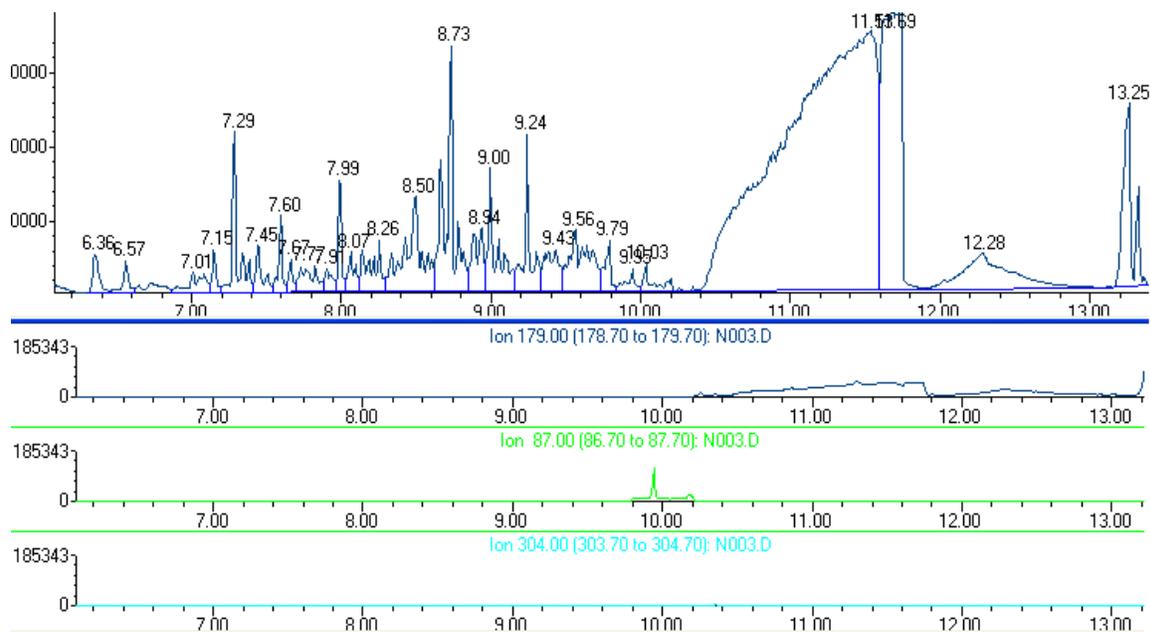


Figura 31

Tiempo de retención del nivel 4 para el segundo monitoreo

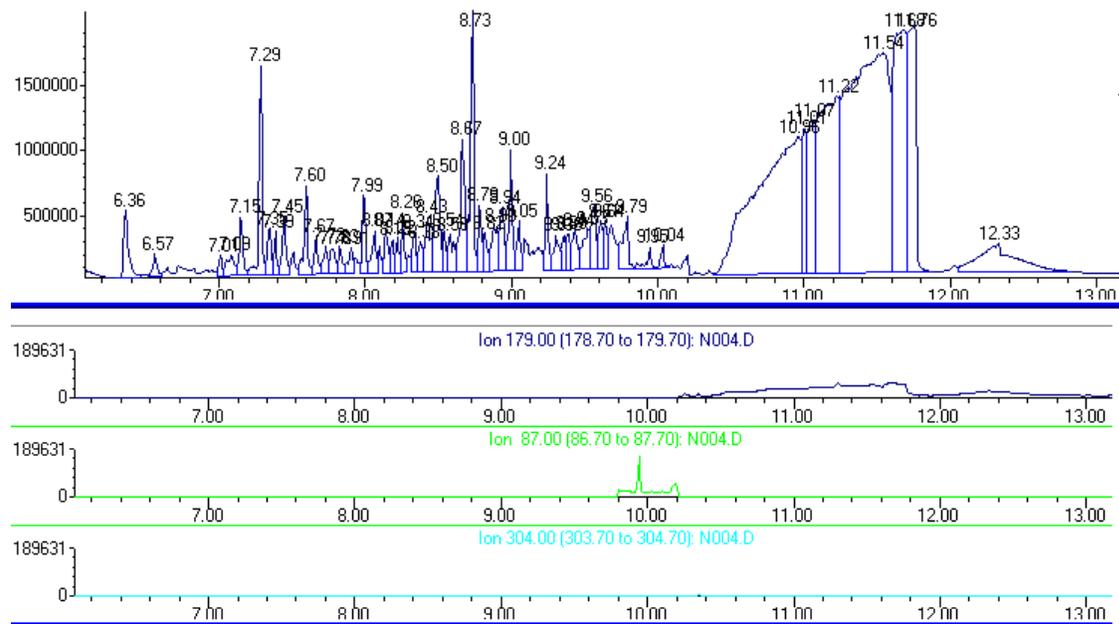


Figura 32

Tiempo de retención para el nivel 5 del segundo monitoreo

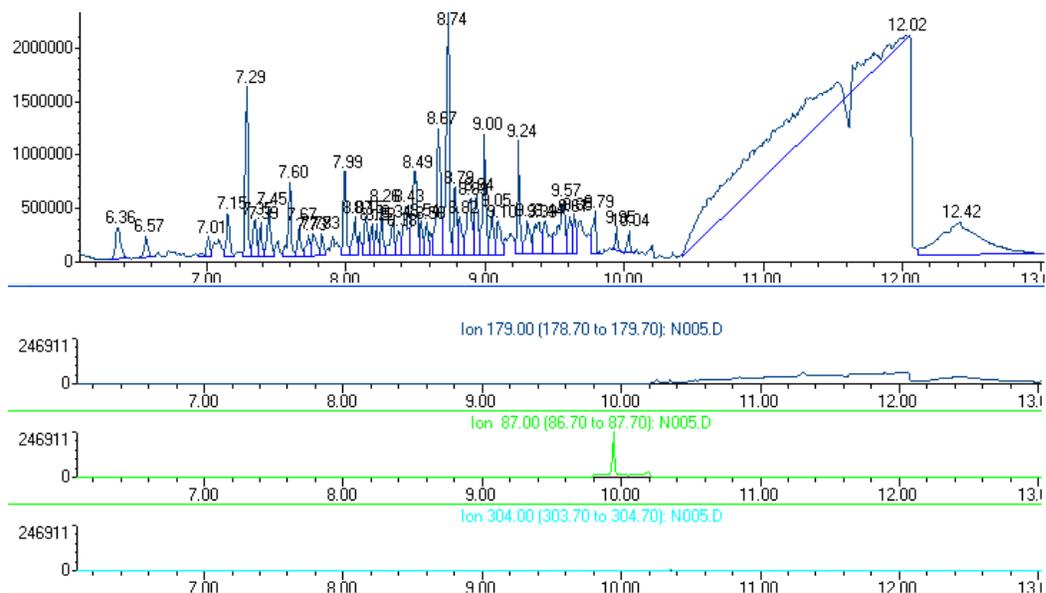
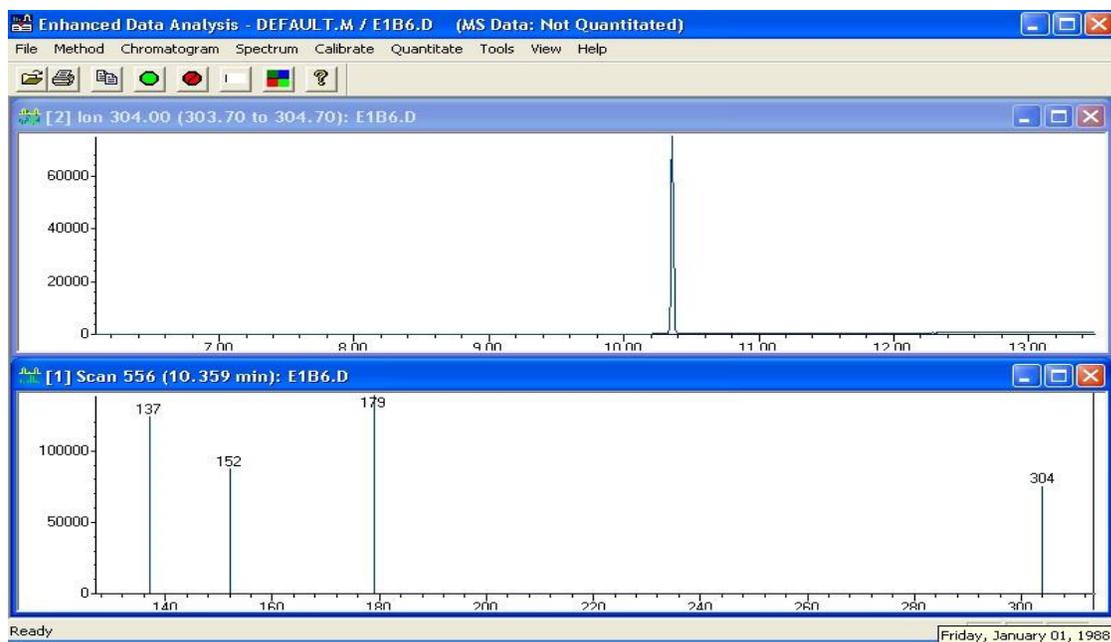


Figura 33

Cromatograma del diazinón con los iones buscados más importantes



Nota: En este cromatograma se muestra el tiempo de retención que tiene el diazinón y, además, los iones buscados en mayor proporción.

Figura 34

Cromatograma del monocrotofos con los iones buscados más importantes

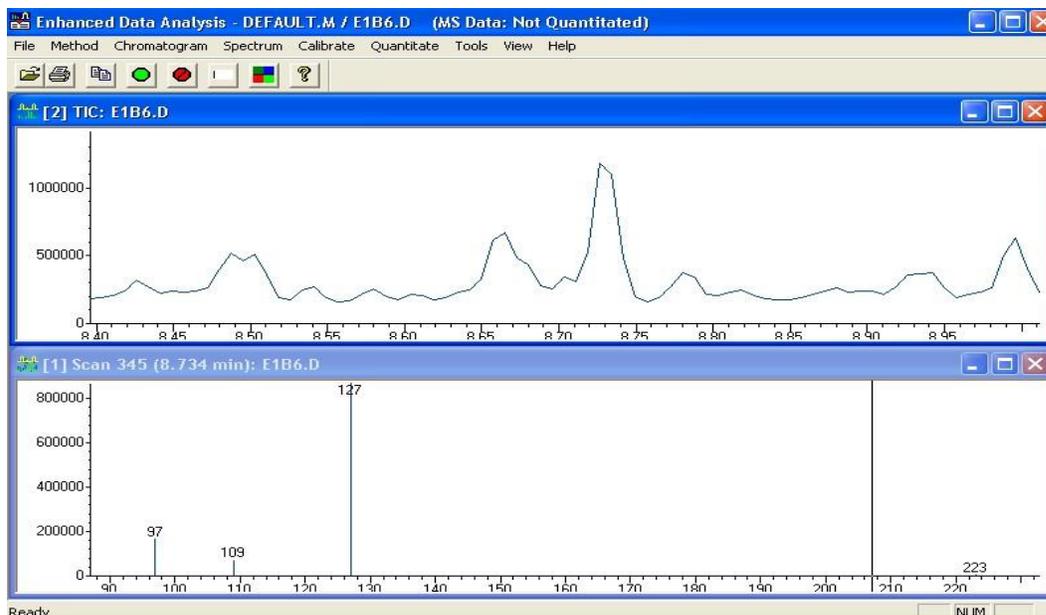
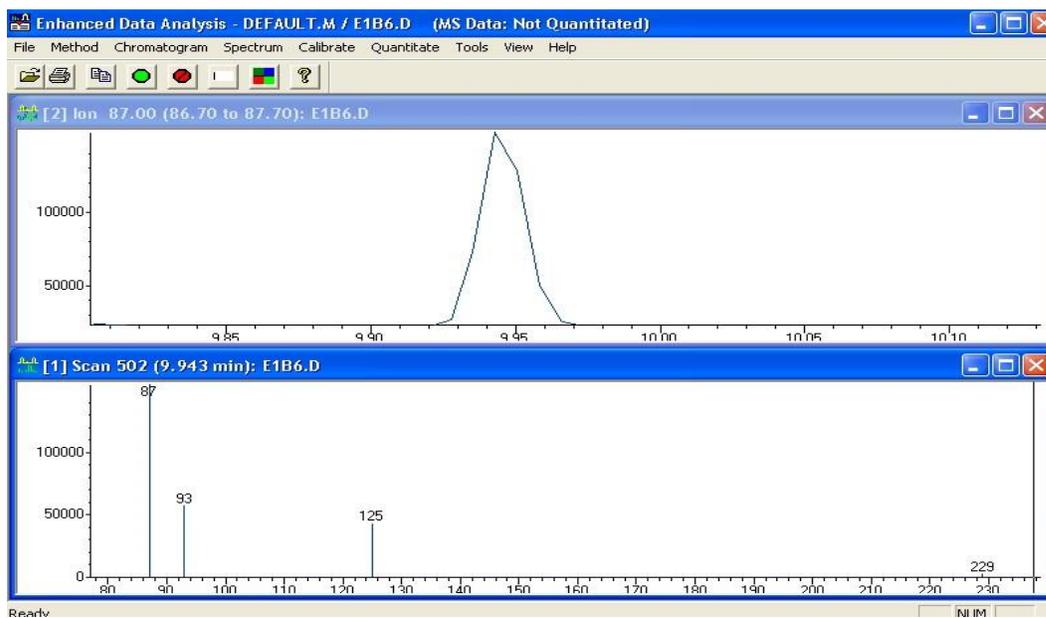


Figura 35

Cromatograma del dimetoato con los iones buscados más importantes



ANEXO 3. BIBLIOTECA DEL NIST

Figura 36

Biblioteca del NIST que muestra los componentes del diazinón

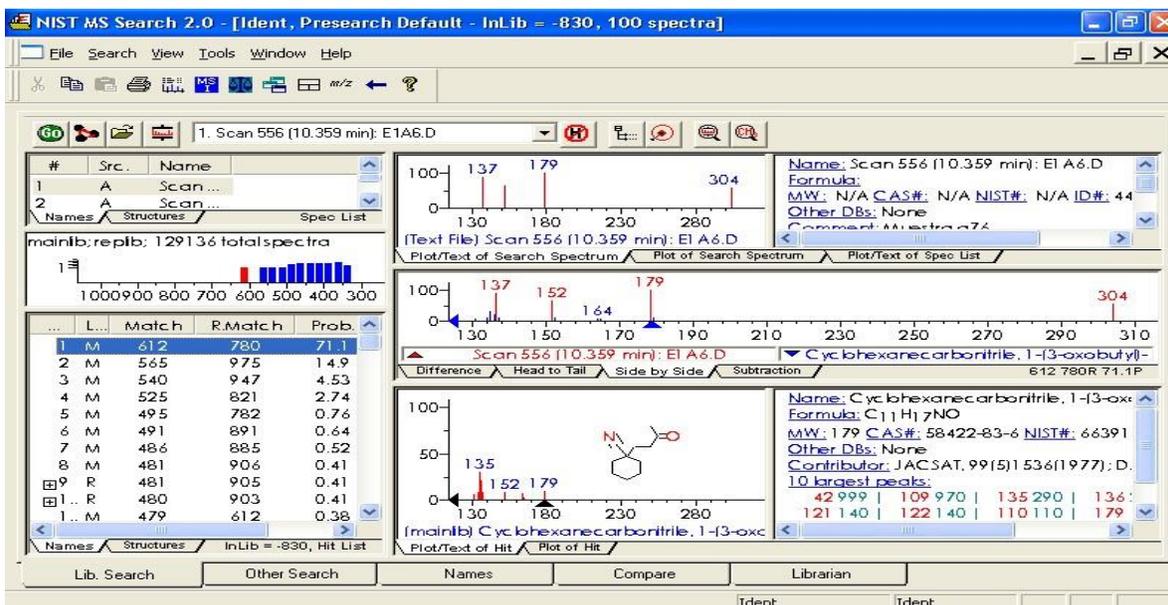


Figura 37

Biblioteca del NIST que muestra los componentes del monocrotofos

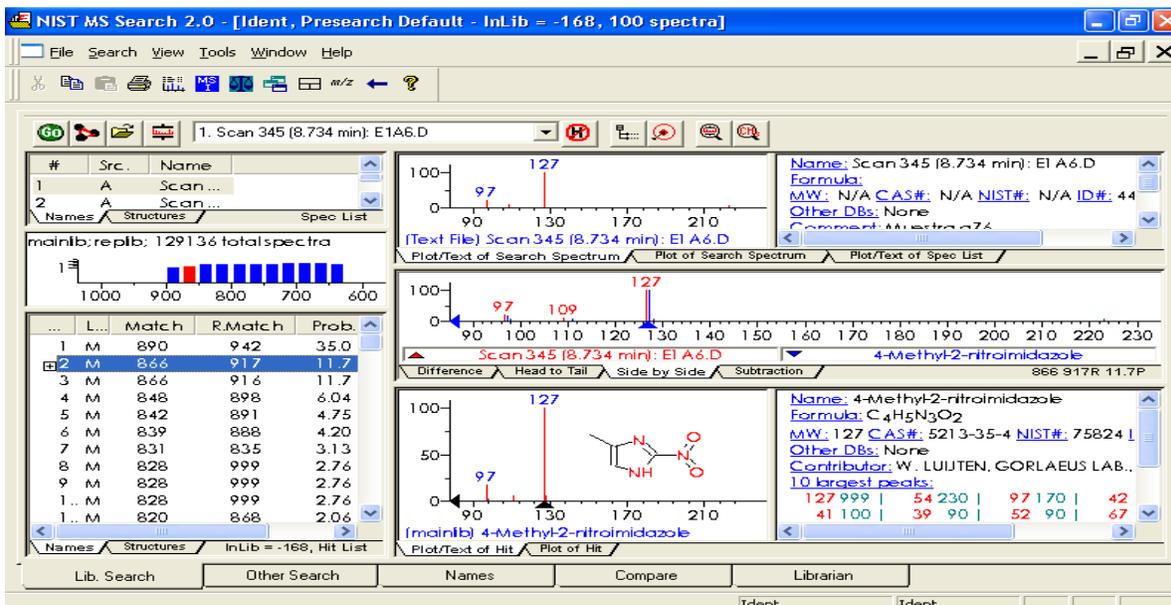
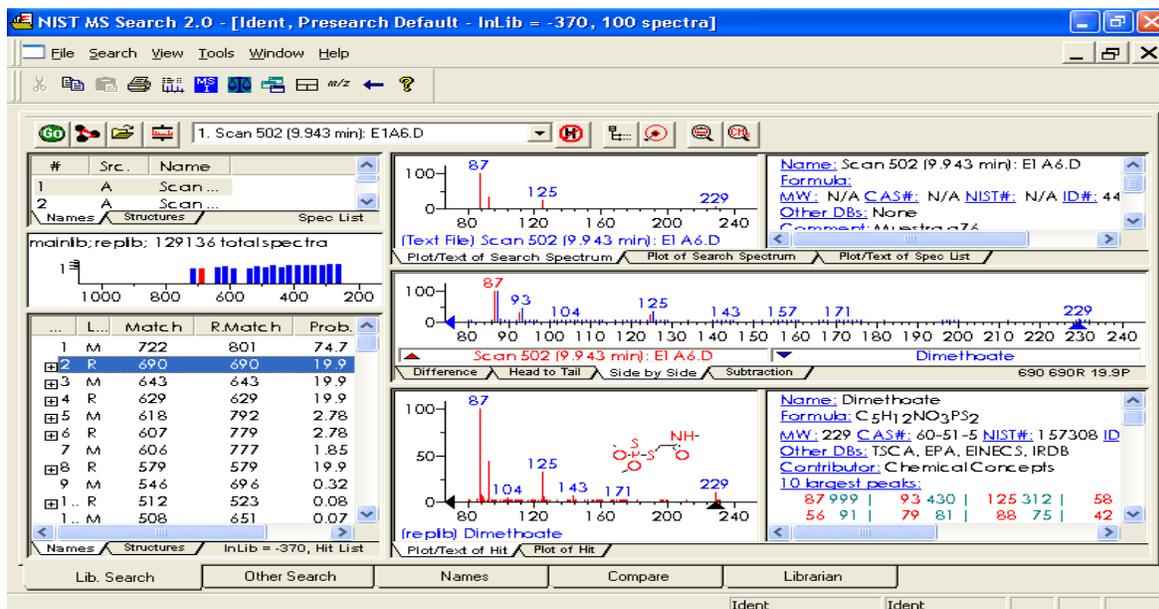


Figura 38

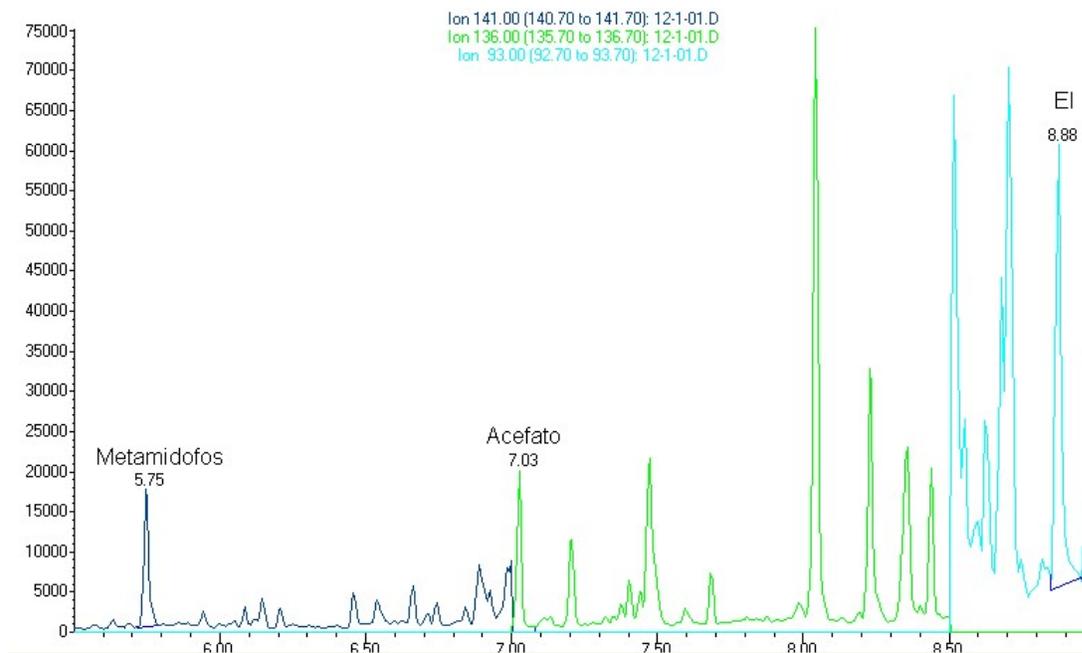
Biblioteca del NIST que muestra los componentes del Dimetoato



ANEXO 4. CROMATOGRAMAS PARA EL MONITOREO DE AUACATE

Figura 39

Cromatograma que muestra las señales de los plaguicidas de monitoreo



Nota: Este cromatograma muestra unos picos en unos tiempos de retención diferentes a los de este monitoreo, que sirven como referencia para para el monitoreo actual.

Figura 40

Cromatograma con los picos de acefato y metamidofos

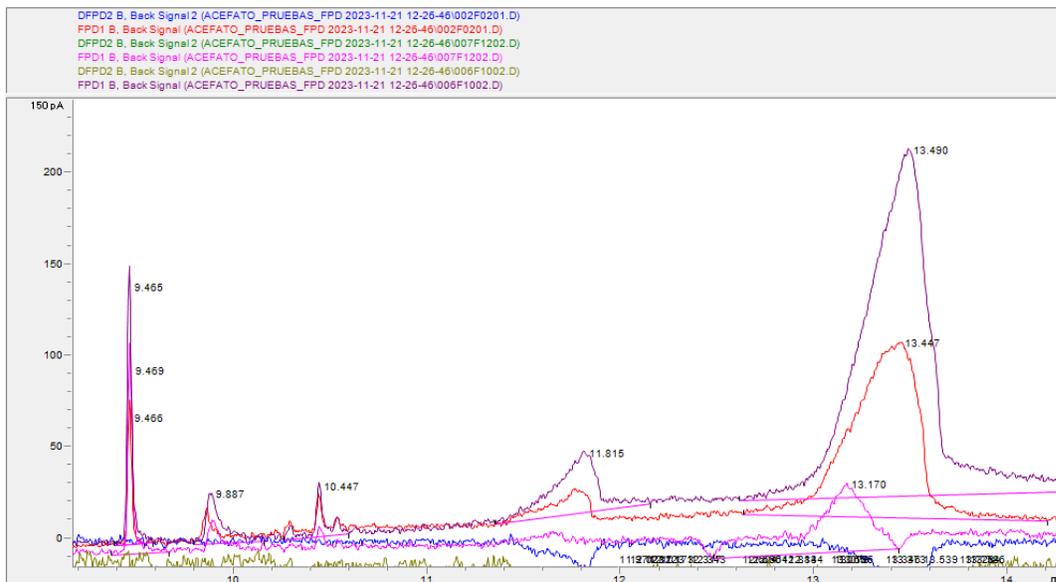


Figura 41

Cromatograma del nivel 1 del monitoreo

