

Fortalecimiento de los Laboratorios Nacionales: *Medición de Residuos de Plaguicidas en Alimentos*



Implementado por:



El progreso es de todos

Mincomercio

Experiencias en la producción de Materiales de Referencia de plaguicidas en material vegetal

Andrés S. Salinas



CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

MR PLAGUICIDAS EN AGUACATE

EVALUACIÓN HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD

CONSIDERACIONES FINALES



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN



Grupo de trabajo (SMQB/GMAO/GMR)

- Laura Morales Erazo
- Diego Alejandro Ahumada
- Ivonne González Cárdenas
- Juliana Constanza Barrios
- Andrés Castillo
- Yeraldin Aguilar
- Juliana Serna
- Andrés Sebastián Salinas



INTRODUCCIÓN

En contexto...



PROTOCOLO PRELIMINAR

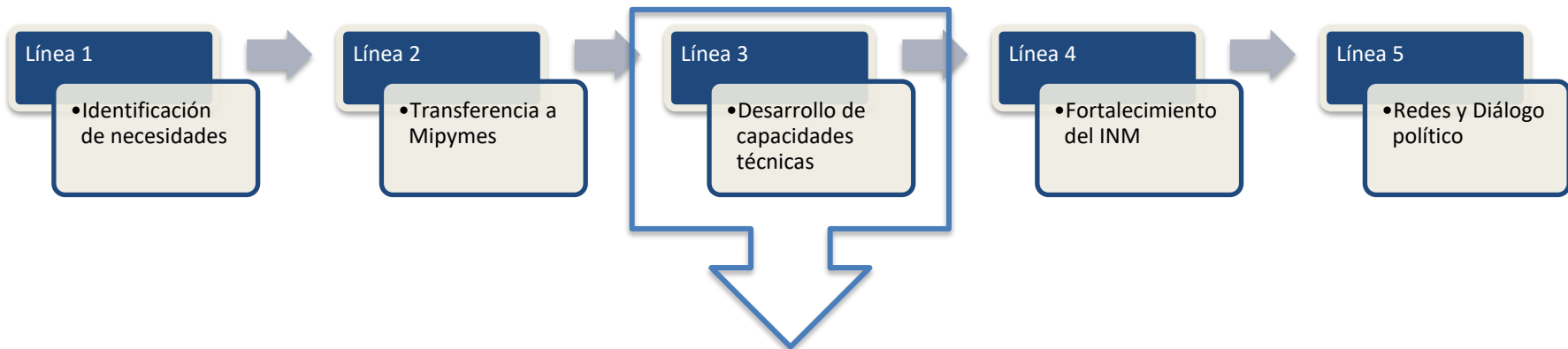
Ensayo de aptitud para la determinación Plaguicidas en Aguacate Hass

Código: 20-INM-EA-05



INTRODUCCIÓN

En contexto...



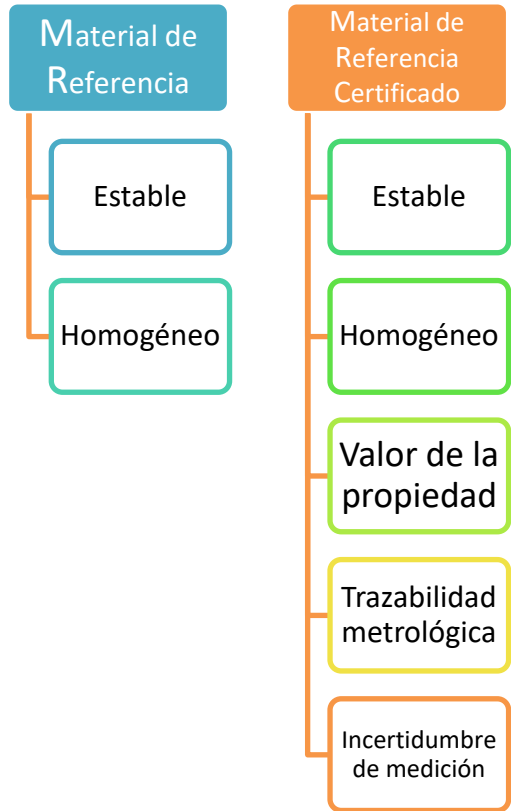
Mejorar las competencias técnicas y metrológicas de entidades públicas y privadas (Mipymes), con el propósito de incrementar el nivel de cumplimiento de estándares y regulaciones técnicas asociadas al comercio sostenible

Material de Referencia (MR): Material suficientemente **homogéneo y estable** respecto a una o más propiedades especificadas, el cual ha sido establecido como apto para su uso en procesos de medición

Homogeneidad es la uniformidad del valor de una propiedad especificada en una porción definida de un MR (entre unidades o dentro de unidades)

Estabilidad es la característica del MR de mantener el valor de la propiedad especificada por un periodo de tiempo definido

INTRODUCCIÓN



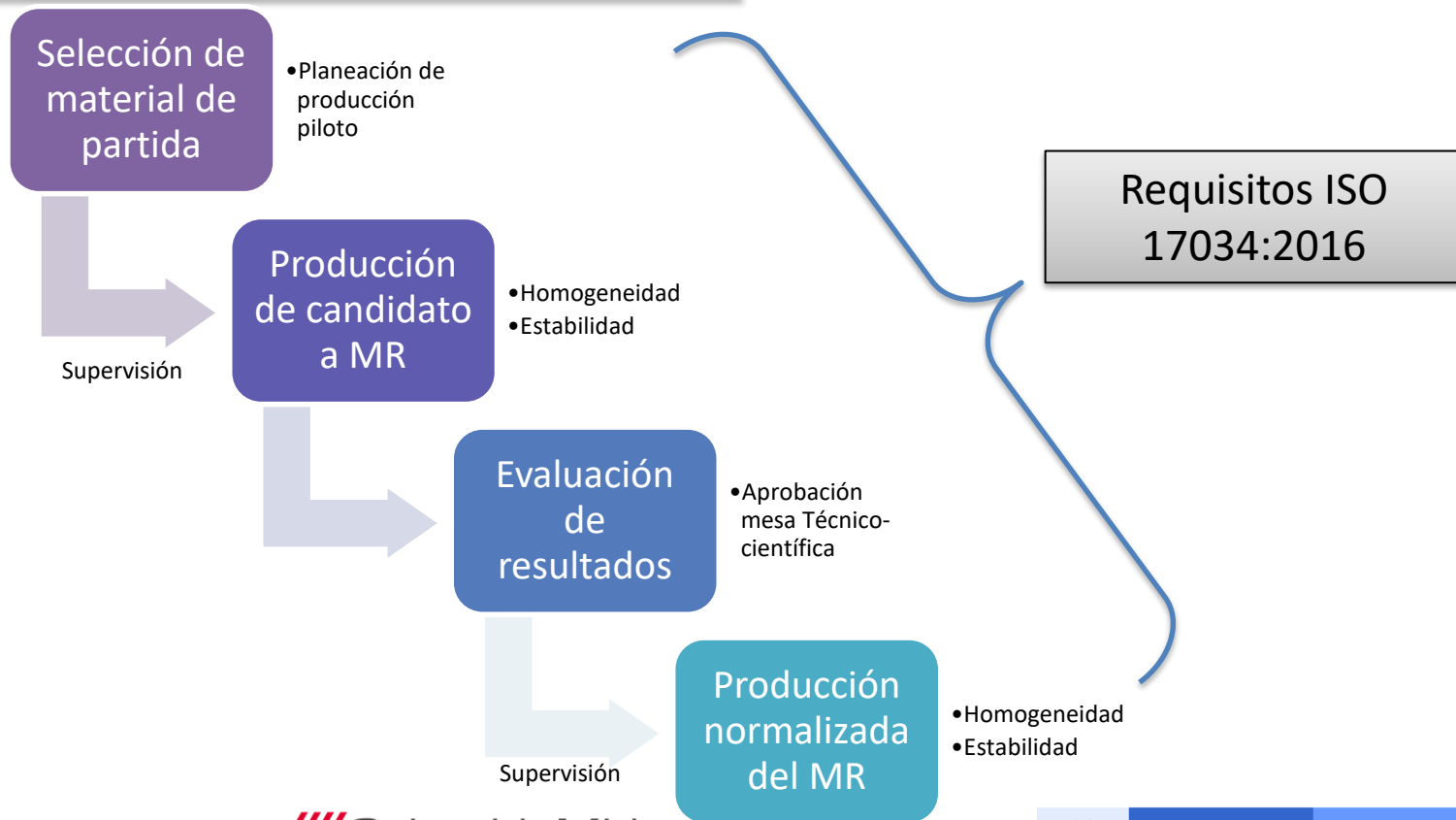
INM
Instituto Nacional de Metrología de Colombia

Nuevos Materiales de Referencia Certificado del INM disponible para todos los laboratorios

Solución de Aflatoxina B1 en acetonitrilo
(fracción másica nominal de 4 mg/kg)

The advertisement shows laboratory glassware including a white bag, two vials, and a certificate, all labeled with the INM logo and product details.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Estrategia CCQM: Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia

1



Calibrantes y
matrices líquidas
de baja
interferencia

Materiales clínicos



Alimentos



Abióticos



INTRODUCCIÓN

Estrategia CCQM: Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia

1



- ❑ > 60% grasa* [Categorías del triángulo alimenticio de la AOAC 1,3]
- ❑ > 60% proteína* [Categorías del triángulo alimenticio de la AOAC 8,9]
- ❑ > 60% carbohidratos* [Categorías del triángulo alimenticio de la AOAC 5,6]
- ❑ Misceláneos* [Categorías del triángulo alimenticio de la AOAC 5,6 2,4,7]

*% de contenido combinado de grasas, proteínas y carbohidratos. No tiene en cuenta otros componentes (agua, fibra, etc)

INTRODUCCIÓN

Estrategia CCQM: Comité Consultivo para la Cantidad de Sustancia

Fracción de masa

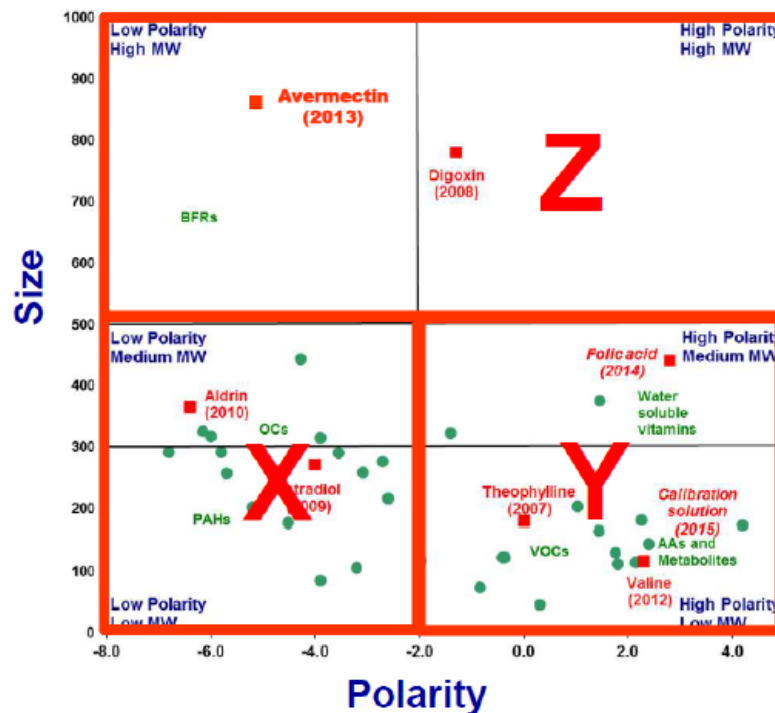
2

- I. $1 \text{ g/kg} < w < 1 \text{ kg/kg}$
- II. $1 \text{ mg/kg} < w < 1 \text{ g/kg}$
- III. $1 \text{ } \mu\text{g/kg} < w < 1 \text{ mg/kg}$
- IV. $w < 1 \text{ } \mu\text{g/kg}$

Polaridad/Masa molecular

3

- X : $\text{MW} < 500$, $\text{pK}_{\text{OW}} < -2$ (no polares)
- Y : $\text{MW} < 500$, $\text{pK}_{\text{OW}} > -2$ (polares)
- Z : $\text{MW} > 500$



MR PLAGUICIDAS EN AGUACATE

Preparación del MR

Selección materia prima

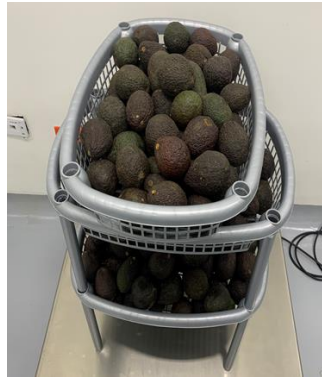
Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Preparación del MR

Selección materia prima

Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Preparación del MR

Selección materia prima

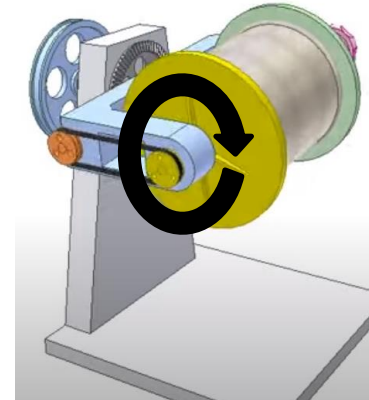
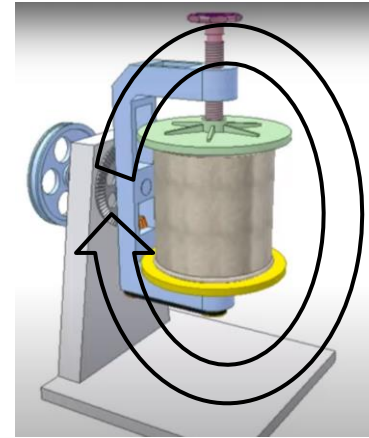
Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Preparación del MR

Selección materia prima

Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



No fortificado



Plaguicidas
aprobados por ICA y
regulados UE, interés
de los laboratorios

Organoclorados,
piretroides,
organofosforados,
triazoles,
neonicotinoides,
carbamatos,
fenilpirazole, entre
otros



Fortificado



GyroMixer

Preparación del MR

Selección materia prima

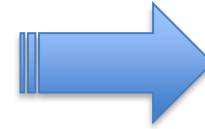
Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Preparación del MR

Selección materia prima

Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Reconstitución

Preparación del MR

Selección materia prima

Separación de la pulpa

Homogenización

Fortificación

Liofilización

Envasado



Molienda

Tamizado



Contenido neto 20 g



Evaluación de homogeneidad

Objetivos de un estudio de Homogeneidad



https://lh3.googleusercontent.com/proxy/f770g00UR1KZZe9vWEWgwcF9Gr8Z7ch_0HS50bGjGxyqTL5mKoD3hqJbSaTnWosFv1p_4GbNGMltlexdyCl_TzQBE36XmnuqX1d4xIOMN5qVMQXJahkrQMwFJvEA

Requisitos de un estudio de Homogeneidad

- Seleccionar un subconjunto representativo de unidades,
- Elegir un método de medición con suficiente repetibilidad y selectividad,
- Realizar las mediciones en condiciones adecuadas siguiendo un diseño experimental apropiado,
- Realizar el análisis estadístico utilizando métodos estadísticos válidos



Estudio de Homogeneidad



Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

$$N_{min} = \max(10, \sqrt[3]{N_{prod}})$$



No. Mínimo de unidades



Tamaño del lote

Usualmente se toma
un 10 % del tamaño
total del lote

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Analito	u target = $\%CV_H/3$	u extracción u instrumental		u simulada
		n=5	n=5	
Abamectin	9,65	5,656%	0,319%	5,665%
Acetamiprid	9,65	2,026%	0,744%	2,159%
Alacloro	9,65	2,652%	1,606%	3,100%
Azoxystrobin	9,65	1,566%	1,313%	2,043%
Benalaxyl	7,57	3,349%	2,547%	4,208%
Chlorpyrifos	9,65	2,891%	2,521%	3,836%
Difenoconazole	5,54	4,456%	1,942%	4,861%
Dimethoate	9,65	1,388%	1,793%	2,268%
Dimetomorph	9,65	1,831%	0,633%	1,938%
Flutriafol	9,65	2,302%	0,688%	2,403%
Malathion	8,69	1,778%	0,445%	1,833%

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Estrategias de muestreo

Muestreo aleatorio simple

- Generación de números aleatorios por software
- Tablas de muestreo

Muestreo aleatorio estratificado



- Se divide la producción por segmentos de igual tamaño
- Se toman aleatoriamente unidades de cada segmento

Muestreo sistemático

- Se establece un intervalo (n_{sist}) y punto de inicio (n_1)
- Se toman unidades cada n veces el intervalo seleccionado ($n_1, n_1+n_{sist}, n_1+2n_{sist} \dots$, etc)

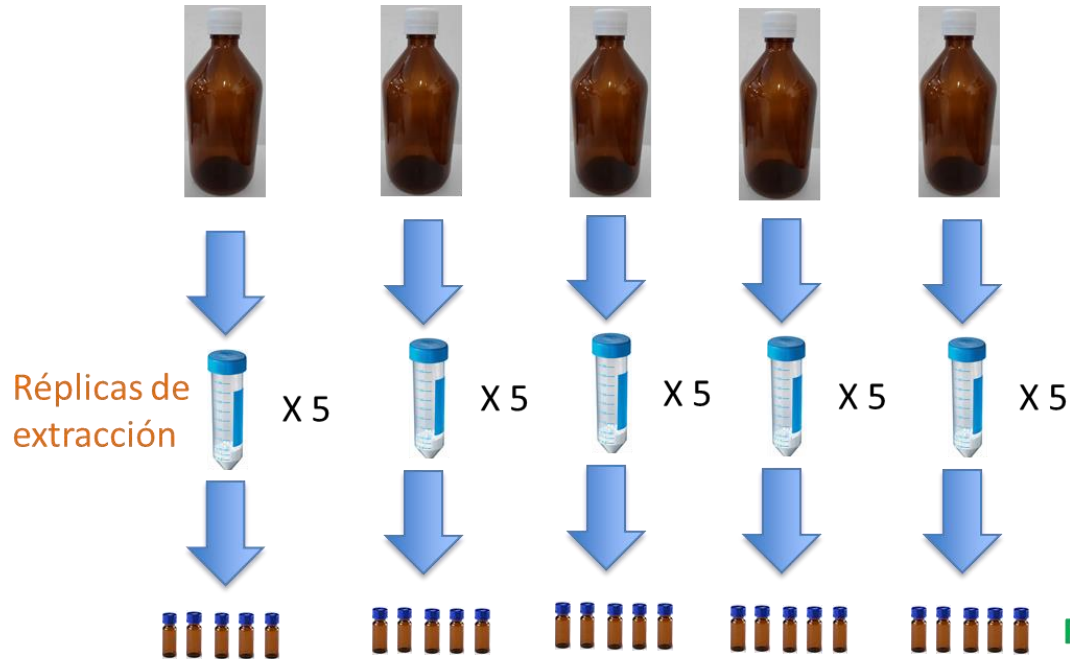
Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre



Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

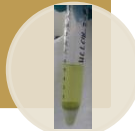
- Procedimiento E6 UNE-EN-15662:2019
- 3 g de muestra

Extracción



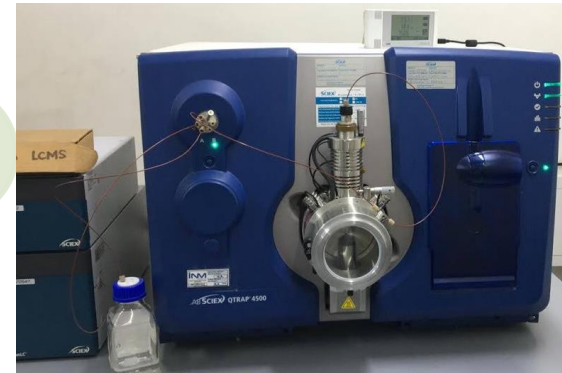
- Opción C2 UNE-EN-15662:2019 (PSA y C18)

Limpieza
(dSPE)



- ESI-LC-MS/MS modo sMRM
- Fase reversa
- Estándar interno: atrazine-d5, diuron-d6 y TPP

Medición
instrumental



Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Diseño del estudio

Diseño aleatorio simple

- Sistema de medición estable
- Todas las observaciones pueden ser adquiridas en una única secuencia

Diseño en bloques aleatorizados

- Análisis de varianza de dos vías

Diseño anidado balanceado

- Se requiere aumentar el número de unidades para mantener los grados de libertad

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Analito	R ² (respuesta relativa)
Azoxystrobin	0,8925
Propamocarb	0,8602
Malathion	0,8340
Monocrotofos	0,7012
Spynosin-a	0,6060
Benalaxyl	0,5722
Methamidophos	0,4722
Trifloxystrobin	0,4684
Tebuconazole	0,4153
Dimethoate	0,3714
Abamectin	0,2762
Spirodiclofen	0,2644
Spynosin-d	0,2635
Thiamethoxam	0,1089

Alta deriva instrumental

Diseño en bloques completamente aleatorizado

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

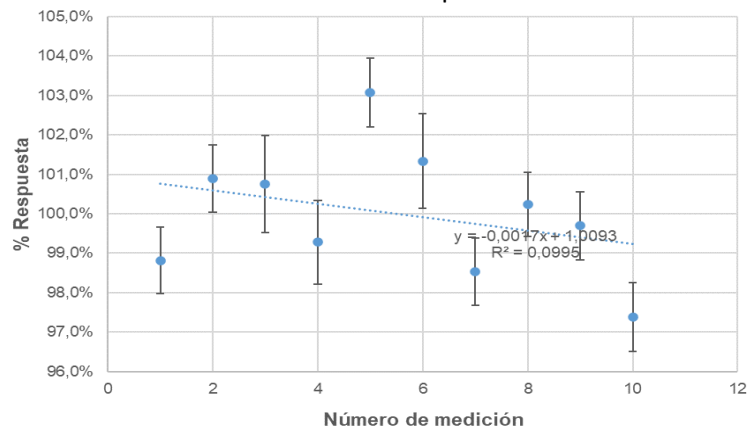
Inspección de tendencias

Análisis estadístico e incertidumbre

Tendencias de medición

Orden de Medición	No. Botella	Respuesta instrumental relativa promedio
1	4	98,8%
2	8	100,9%
3	12	100,8%
4	14	99,3%
5	28	103,1%
6	29	101,3%
7	34	98,5%
8	35	100,2%
9	41	99,7%
10	48	97,4%

Methamidophos



MEDICIÓN

<i>Pendiente e intercepto</i>	-0,0017	1,0093
<i>Error típico de los estima</i>	0,0018	0,0111
<i>R2 y Error típico de la reg</i>	0,0995	0,0163
<i>F calculado</i>	0,8843	8,0000
<i>suma de cuadrados</i>	2,35,E-04	2,12,E-03
<i>Estadístico t</i>	-0,94038	90,66382
<i>p de aceptar H0</i>	0,3745	

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

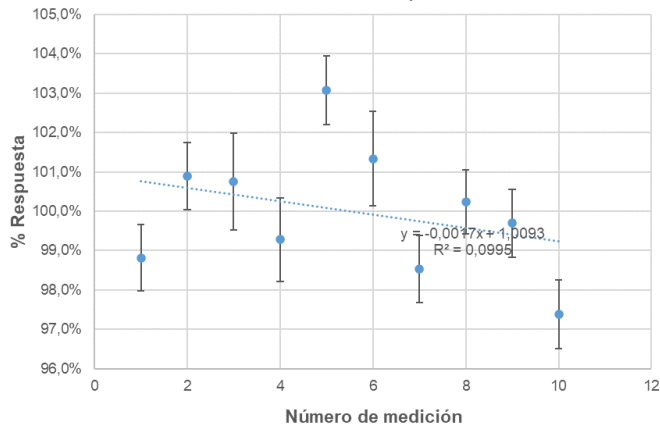
Medición

Inspección de tendencias

Análisis estadístico e incertidumbre

Tendencias de medición

Methamidophos



MEDICIÓN

<i>Pendiente e itercepto</i>	-0,0017	1,0093
<i>Error típico de los estima</i>	0,0018	0,0111
<i>R2 y Error típico de la reg</i>	0,0995	0,0163
<i>F calculado</i>	0,8843	8,0000
<i>suma de cuadrados</i>	2,35,E-04	2,12,E-03
<i>Estadístico t</i>	-0,94038	90,66382
<i>p de aceptar H0</i>	0,3745	

{Estimacion.lineal}

=1-DISTR.F.N(F calculado;G.L numerador;G.L denominador;VERDADERO)

Sí p-valor>0,05 no hay evidencia de tendencia de medición

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Tendencias de medición

Resumen

Estadísticas de la regresión

Coefficiente de correlación múltiple	0,315494885
Coefficiente de determinación R ²	0,099537022
R ² ajustado	-0,01302085
Error típico	0,016295735
Observaciones	10

p-valor = 1 - DISTR.F.N(F calculado; G.L. numerador; G.L. denominador; VERDADERO)

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	p-valor
Regresión	1	0,000234832	0,000234832	0,8843186	0,374544536	0,37454454
Residuos	8	0,002124408	0,000265551			
Total	9	0,00235924				

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	1,009279275	0,011132107	90,66381754	2,445E-13	0,983608592	1,03494996	0,9836086	1,03495
Variable X 1	-0,001687141	0,001794101	-0,940382167	0,3745445	-0,005824346	0,00245006	-0,0058243	0,0024501

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

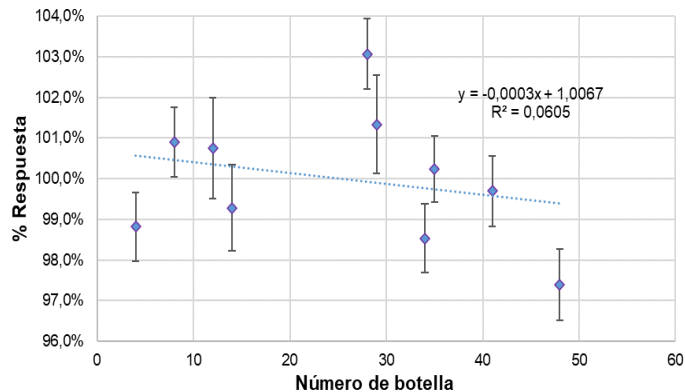
Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Tendencias de envasado

Orden de Medición	No. Botella	Respuesta instrumental relativa promedio
1	4	98,8%
2	8	100,9%
3	12	100,8%
4	14	99,3%
5	28	103,1%
6	29	101,3%
7	34	98,5%
8	35	100,2%
9	41	99,7%
10	48	97,4%

Methamidophos



ENVASADO

Pendiente e itercepto	-0,0002664	1,0067395
Error típico de los estima	0,0003713	0,0107675
R2 y Error típico de la reg	0,0604591	0,0166456
F calculado	0,5147973	8,0000000
suma de cuadrados	0,0001426	0,0022166
Estadístico t	-0,71749	93,49820
p de aceptar H0	0,49	

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

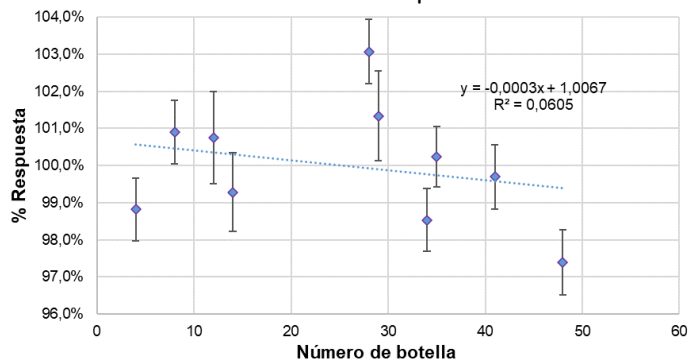
Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Tendencias de envasado

Methamidophos



ENVASADO

<i>Pendiente e itercepto</i>	-0,0002664	1,0067395
<i>Error típico de los estima</i>	0,0003713	0,0107675
<i>R2 y Error típico de la reg</i>	0,0604591	0,0166456
<i>F calculado</i>	0,5147973	8,0000000
<i>suma de cuadrados</i>	0,0001426	0,0022166
<i>Estadístico t</i>	-0,71749	93,49820
<i>p de aceptar H0</i>		0,49

Sí $p\text{-valor} > 0,05$ no hay evidencia de tendencia de envasado

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Tendencias de envasado

Analito	p-valor regresión	R ²
Abamectin	0,0674	0,7243
Acetamiprid	0,8096	0,0225
Alachlor	0,6994	0,0568
Azoxystrobin	0,8969	0,0066
Benalaxyl	0,1891	0,4885
Chlorpyrifos	0,5810	0,1126
Difenoconazole	0,9222	0,0037
Dimethoate	0,8533	0,0133
Dimethomorph	0,2070	0,4618
Flutriafol	0,2609	0,3889
Malathion	0,9839	0,0002

Analito	p-valor regresión	R ²
Methamidophos	0,7115	0,0523
Monocrotofos	0,6259	0,0890
Propamocarb	0,0433	0,7914
Spiroclufen	0,9514	0,0015
Spiromesifen	0,7753	0,0315
Spynosin-A	0,5279	0,1445
Spynosin-D	0,0649	0,7308
Tebucanazole	0,3443	0,2948
Thiacloprid	0,7403	0,0422
Thiamethoxam	0,5717	0,1178
Trifloxystrobin	0,9420	0,0021

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Botella	1	9	16	27	44
Replica 1	1,23293	1,18067	1,14438	1,15928	1,30294
Replica 2	1,23534	1,24412	1,21033	1,20835	1,23601
Replica 3	1,19553	1,24061	1,24861	1,26878	1,34386
Replica 4	1,20868	1,18848	1,16672	1,20984	1,22303
Replica 5	1,22445	1,27229	1,15359	1,32537	1,22663
Replica 6	1,24664	1,20305	1,18142	1,13751	1,16712
Replica 7	1,15318	1,15555	1,21048	1,21717	1,28262
Replica 8	1,28520	1,26709	1,12392	1,17184	1,30812
Replica 9	1,15896	1,28948	1,15769	1,19105	1,30402
Replica 10	1,21067	1,23304	1,17699	1,25097	1,12606
Replica 11	1,20379	1,32314	1,18455	1,18346	1,17289
Replica 12	1,30447	1,19612	1,22307	1,21331	1,18649
Replica 13	1,18358	1,14516	1,23485	1,27971	1,18178
Replica 14	1,21602	1,29762	1,03171	1,25263	1,20436
Replica 15	1,18556	1,24460	1,12029	1,26326	1,21989
Replica 16	1,26188	1,23517	1,25324	1,22726	1,29728
Replica 17	1,25200	1,25290	1,13019	1,10176	1,26630
Replica 18	1,23892	1,21411	1,09455	1,19199	1,20577
Replica 19	1,22089	1,28837	1,20768	1,19189	1,24783
Replica 20	1,14981	1,13649	1,24933	1,25204	1,17805
Replica 21	1,21809	1,15455	1,21680	1,05218	1,25729
Replica 22	1,15995	1,20450	1,27282	1,18349	1,23385
Replica 23	1,22975	1,20093	1,09312	1,17035	1,26497
Replica 24	1,29867	1,26336	1,17346	1,33328	1,13459
Replica 25	1,18828	1,18640	1,15581	1,14954	1,08885
% RESPUESTA	101%	101%	97%	100%	101%
Desviación	0,04	0,05	0,06	0,06	0,06
%CV	3,48%	4,14%	4,95%	5,31%	5,15%

$n_{\text{prod}}=50$



Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F0	p-valor
Entre botellas	2,1889E-02	4	5,47E-03	1,2901	0,28
Bloque	2,9201E-02	3	9,73E-03		
Error (residual)	4,9626E-01	117	4,24E-03		
Total	5,4735E-01	124			

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Replicas por botella	25
No. de botellas	5
Bloques	4
Observaciones	125
F tabla:	3,26

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio (CM)	F0	p-valor
Entre botellas	2,1889E-02	4	5,47E-03	1,2901	0,28
Bloque	2,9201E-02	3	9,73E-03		
Error (residual)	4,9626E-01	117	4,24E-03		
Total	5,4735E-01	124			

$$u_{hom}^2 = \frac{|CM_{entre} - CM_{error}|}{No. de botellas}$$

$$u_{hom} = \sqrt{\frac{5,47 \times 10^{-3} - 4,24 \times 10^{-3}}{5}}$$

$$u_{hom}(\%) = \frac{u_{hom}}{Promdio de todas las observaciones} * 100$$

Estudio de Homogeneidad

Muestreo

Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre

Replicas por botella	25
No. de botellas (N)	5
Bloques	4
Observaciones	125
F tabla:	3,26

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio (CM)	F0	p-valor
Entre botellas	2,1889E-02	4	5,47E-03	1,2901	0,28
Bloque	2,9201E-02	3	9,73E-03		
Error (residual)	4,9626E-01	117	4,24E-03		
Total	5,4735E-01	124			

$$u_{\text{hom metodo}}(\%) = \frac{\left(\sqrt{\frac{CM_{\text{error}}}{N}} \cdot \sqrt[4]{\frac{2}{N-1}} \right)}{\text{Promedio observaciones}} * 100$$

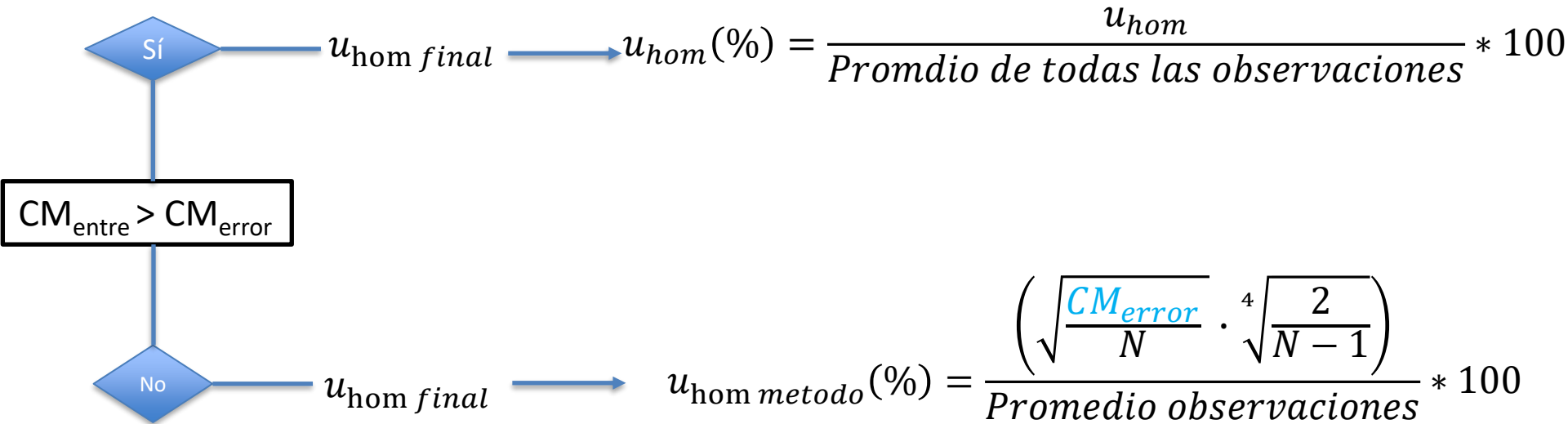
Estudio de Homogeneidad

Muestreo

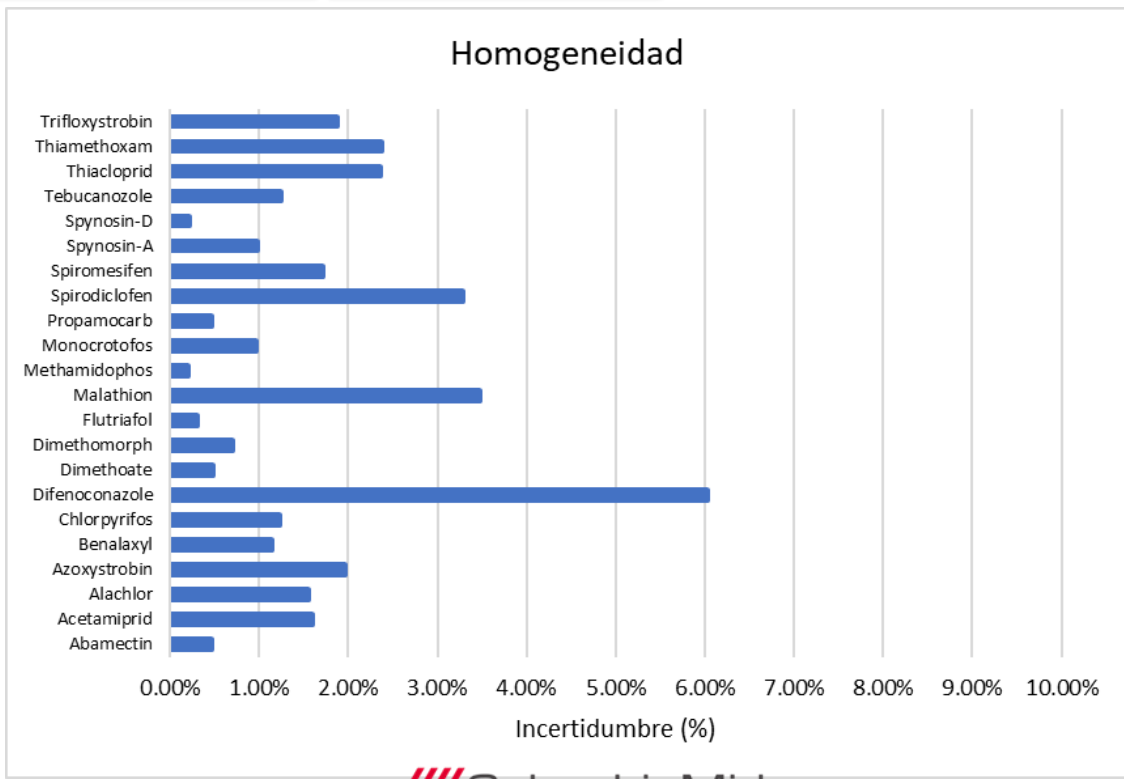
Medición

Inspección de
tendencias

Análisis
estadístico e
incertidumbre



Estudio de Homogeneidad



Evaluación de estabilidad

Evaluación de estabilidad

- El estudio del cambio en la propiedad de interés en el MR sobre el tiempo
 - Transporte
 - Almacenamiento por el productor
 - Almacenamiento por el usuario
- Proveer recomendaciones sobre el correcto almacenamiento
- Estimar el aporte a la incertidumbre
- Cuando no se tiene conocimiento previo sobre la estabilidad del MR, se requiere llevar a cabo evaluación experimental

Tipos de estudios

Condiciones de medición



Estudios clásicos

Estudios isócronos

Duración y condiciones



Estudios en tiempo real

Estudios acelerados

Por objetivo



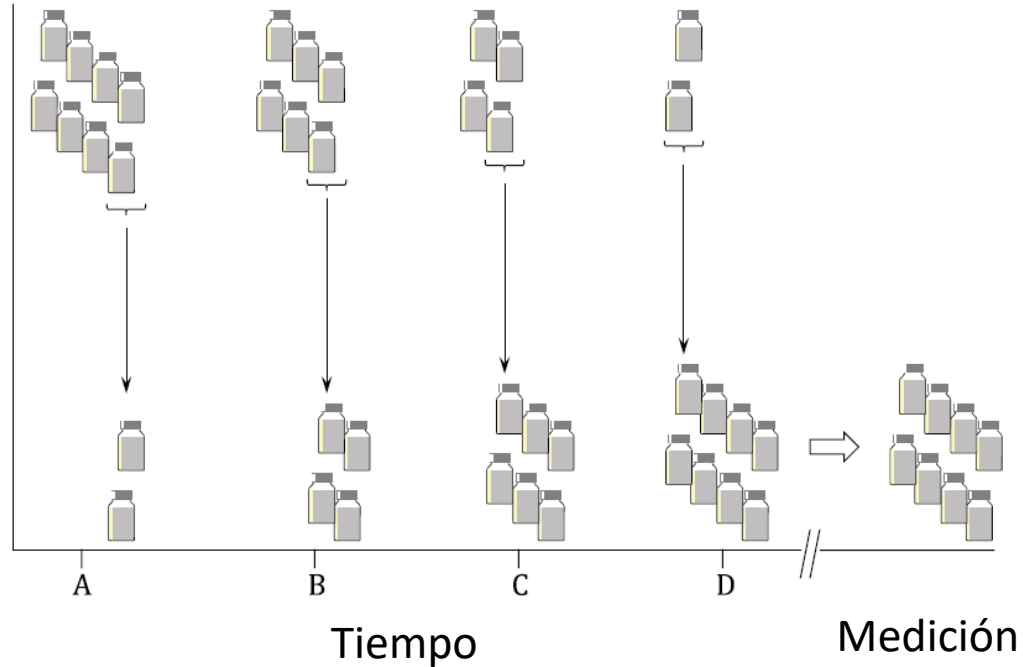
Estudios de transporte o de corto tiempo

Estudios a largo término

Estudio isocrono

Almacenamiento
4 °C y 40 °C

Temperatura de
referencia -80 °C



Tipos de estudios

Mediciones hechas en un corto periodo de tiempo bajo condiciones de repetibilidad

Reducción de costos y optimización tiempos de laboratorio

Resultados obtenidos hasta el final del estudio
Pueden ocurrir cambios a la condición de referencia (p.e congelamiento), lo que lleva a falsas conclusiones

Diseño experimental estudio estabilidad a corto plazo 4 °C



X 3

X 3

X 3

X 3

X 3

X 3



$t_0 = 0$ días

$t_1 = 8$ días

$t_2 = 14$ días

$t_3 = 28$ días

$t_4 = 39$ días

$t_5 = 45$ días



Instituto Nacional
de Metrología
de Colombia



ColombiaMide

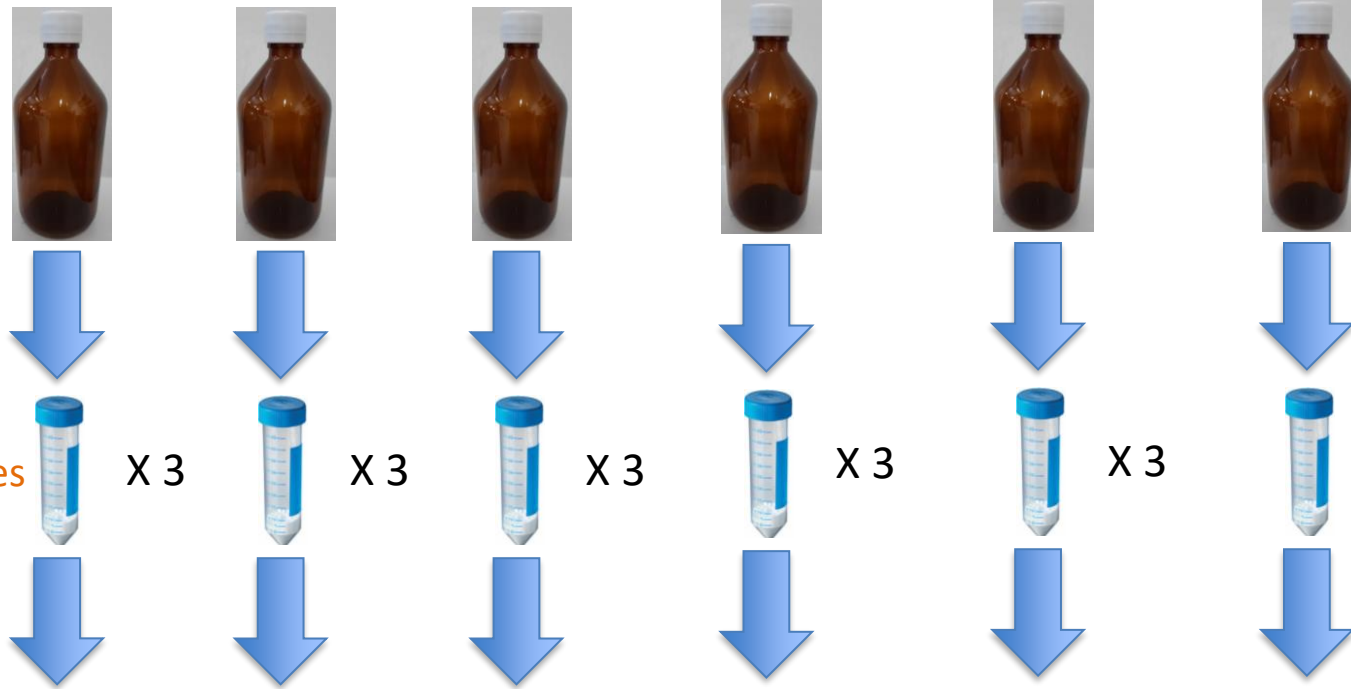
Competitividad territorial:
confianza en tus mediciones, calidad en tus productos



El progreso
es de todos

Mincomercio

Diseño experimental estudio estabilidad acelerado a 40 °C



Extracciones

X 3

X 3

X 3

X 3

X 3

X 3

$t_0 = 0$ días

$t_1 = 7$ días

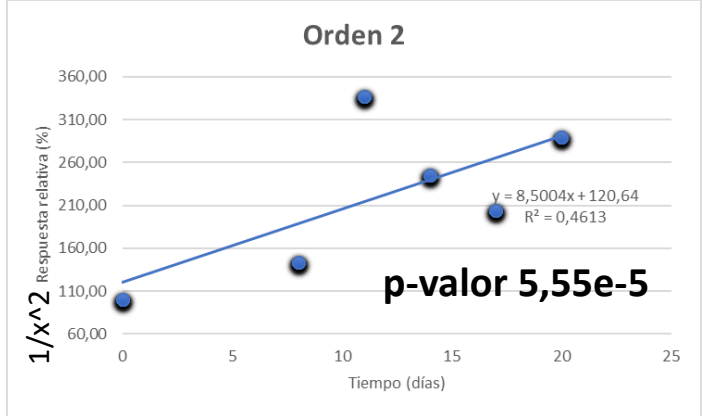
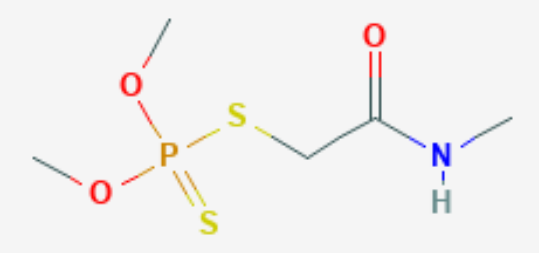
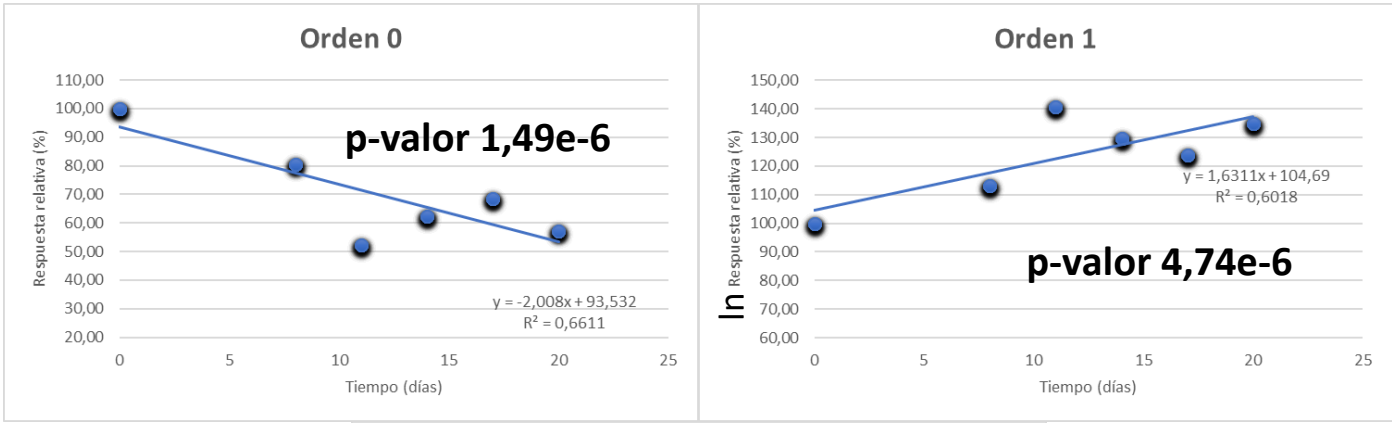
$t_2 = 11$ días

$t_3 = 15$ días

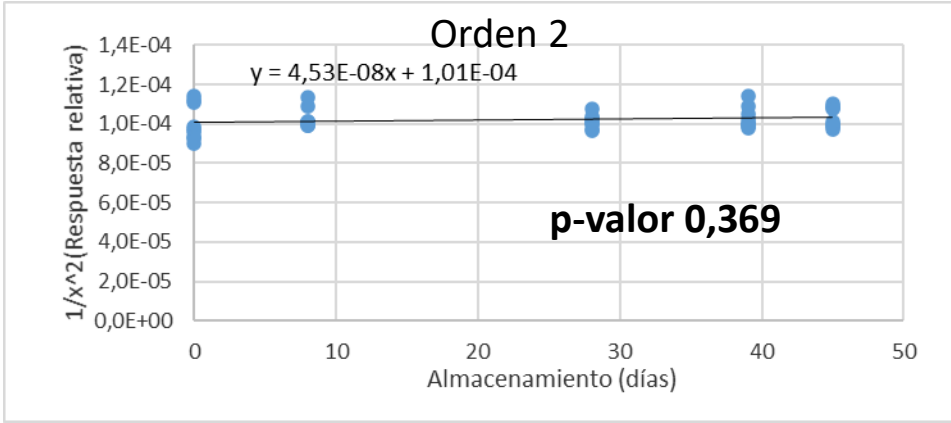
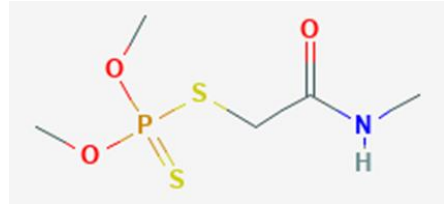
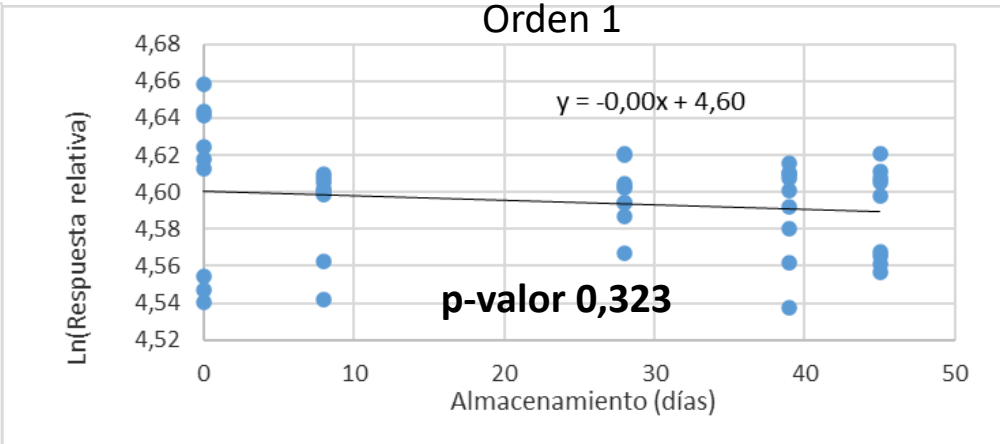
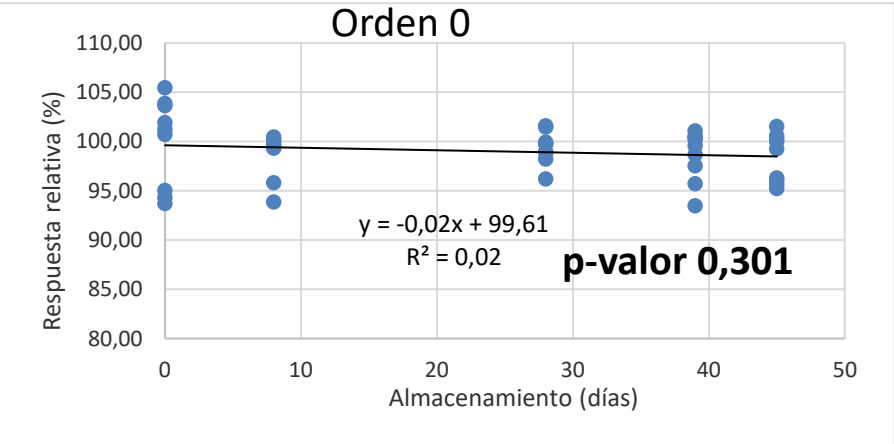
$t_4 = 18$ días

$t_5 = 21$ días

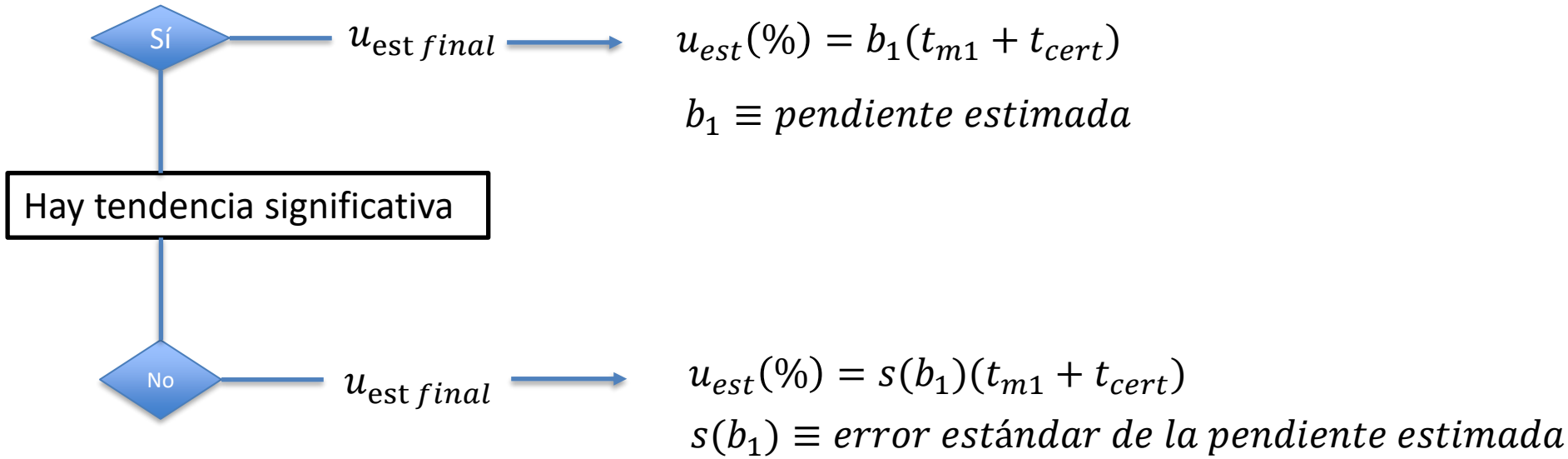
Estudio estabilidad acelerado Dimetoato a 40 °C



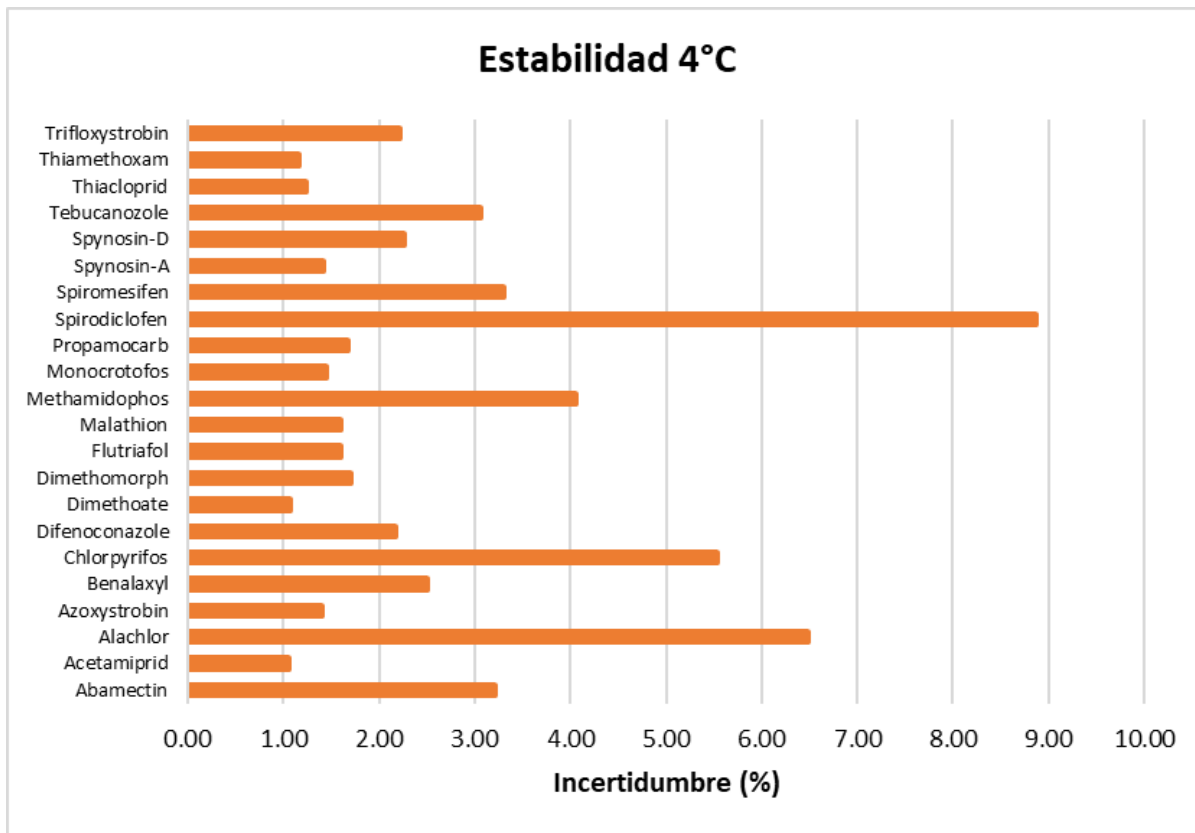
Estudio estabilidad a corto plazo Dimetoato a 4 °C



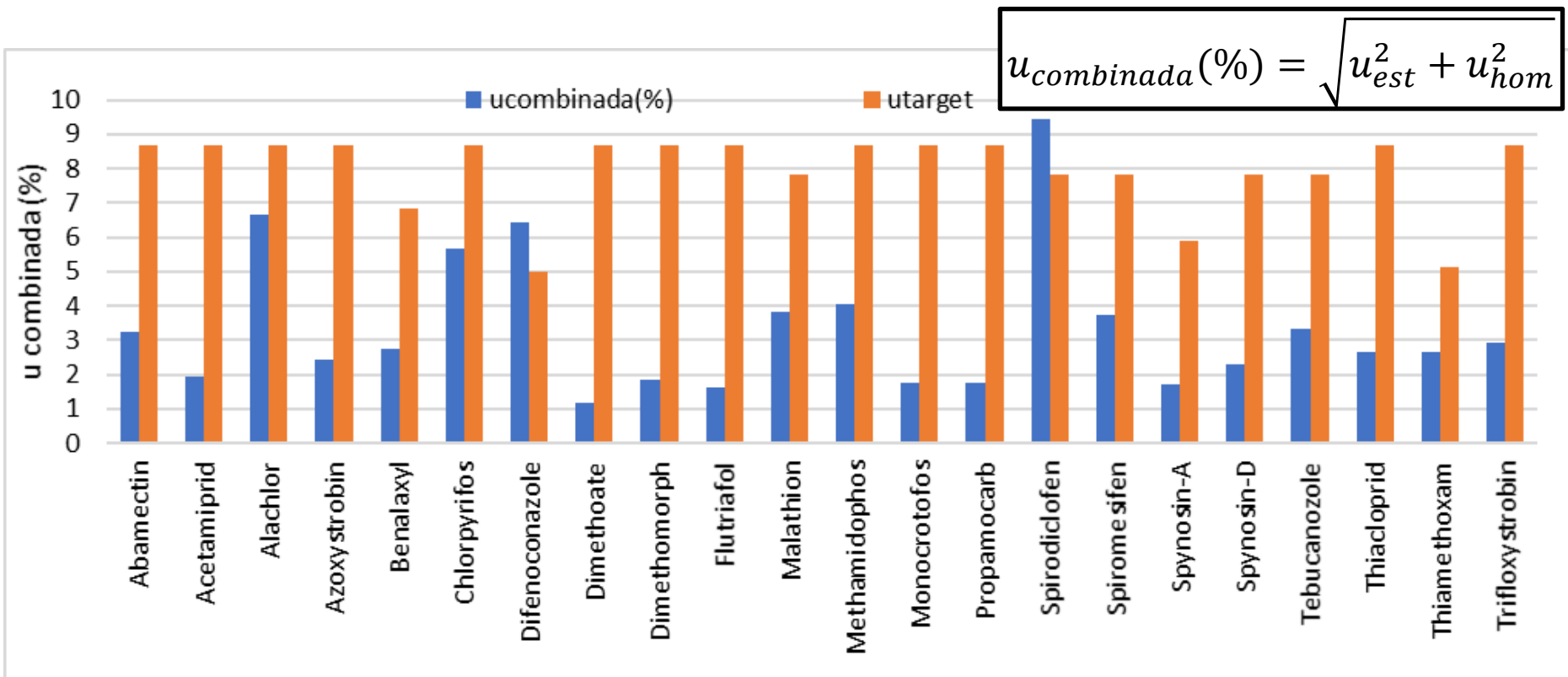
Estimación de incertidumbre por estabilidad



Resultados: Incertidumbre por estabilidad a 4 °C



Resultados: Incertidumbre combinada



Consideraciones finales

- ✓ Se logró obtener un MR de plaguicidas en aguacate Hass liofilizado el cual presentó incertidumbre por homogeneidad y estabilidad acordes para el fin previsto.
- ✓ El MR de plaguicidas en aguacate Hass pudo ser empleado como ítem de comparación en el Ensayo de Aptitud 20-INM-EA-05.

**Gracias por su amable
atención**