MÉTODO ALTERNATIVO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS, PARA DETERMINAR CARBAMATOS EN VEGETALES FRESCOS

ANDREA CUMBA
Universidad Central del Ecuador

MARCELO DÁVALOS
Universidad Central del Ecuador

Resumen

Se optimizaron las condiciones de extracción asistida por microondas, acoplado a un método de cuantificación por cromatografía líquida, para determinar la concentración a nivel de trazas, de los plaguicidas carbofuran, carbaryl, aldicarb y methiocarb en tomate. Y se utilizó esta aplicación en la verificación del cumplimiento de los LMRs establecidos, en las plantaciones de tomate en estudio.

En el procedimiento de extracción, los residuos de plaguicidas fueron extraídos con 20 mL de acetonitrilo, al que se le agregó cloruro de sodio, a 60°C, por 10 min, 1.500 W. Se identificó unívocamente y se cuantificó carbaryl, carbofuran, aldicarb y methiocarb, por cromatografía líquida con detector ultravioleta, utilizando como fase móvil Acetonitrilo/ Agua (45:55), a diferentes longitudes de onda entre 200- 221 nm.

Se validó el método analítico de Extracción asistida por microondas y de Cuantificación por cromatografía HPLC, para garantizar la confiabilidad y la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud-veracidad, límite de detección y límite de cuantificación. Con respecto a aldicarb, carbaryl, methiocarb y carbofuran, el método resultó ser lineal en el intervalo de trabajo de 50 ug/Kg a 3.000 ug/Kg. Para **aldicarb**, los coeficientes de variación en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad fueron de 1,0% y 1,2% respectivamente, el porcentaje de recuperación fue 92,3%, los límites de detección y cuantificación del método fueron de 17 ug/Kg y 50 ug/Kg respectivamente, y la incertidumbre de 25%. Para **carbaryl**, los coeficientes de variación en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad fueron de 2,4 %, el porcentaje de recuperación fue 94,3%, los límites de detección y cuantificación del método fueron de 17 ug/Kg y 50 ug/Kg respectivamente, y la incertidumbre de 15%. Para **carbofuran**, los coeficientes de variación en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad fueron de 2,16 y 2,55 %, el porcentaje de recuperación fue 95,2%, los límites de detección y cuantificación del método fueron de 22 ug/Kg y 50 ug/Kg respectivamente, y la incertidumbre de 33%. Para **methiocarb**, los coeficientes de variación en la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad fueron de 1,9 y 2,4% respectivamente, el porcentaje de recuperación fue 95,6%, los límites de detección y cuantificación del método fueron de 19 ug/Kg y 50 ug/Kg respectivamente, y la incertidumbre de 31%.

El método validado se aplicó en el control de carbamatos en tomates de la zona de Urcuquí-Imbabura y se cuantificó carbaryl en tres de cuatro localidades muestreadas, pero las cantidades determinadas no sobrepasan los límites máximos de residuos permitidos.

Palabras clave: carbamatos, productos agrícolas, microondas, asistida, cromatografía líquida.

Introducción

Las prácticas agrícolas obtienen del uso de plaguicidas, reducciones considerables en las pérdidas de los cultivos y mejoramiento en el rendimiento de la producción. Sin embargo, el uso indiscriminado de los agroquímicos ha tenido como consecuencia, la acumulación de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen agrícola, generando problemas de salud a la población humana y animal que los consume. En Ecuador, la población consume gran cantidad de vegetales y frutas cultivados en plantaciones a cielo abierto o en invernaderos, en donde se utilizan plaguicidas. Por esta razón, es necesario controlar su utilización y valorar la exposición de los productos agrícolas. En vista de esta necesidad, varias organizaciones, entre las que se encuentran la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), han implementado normas de buenas prácticas agrícolas y han establecido límites máximos de residuos para plaguicidas.

Especial interés surge en la determinación de plaguicidas carbamatos, ya que sus residuos en vegetales de consumo humano, tienen un gran potencial carcinogénico para la población. Y están sujetos a procesos de biotransformación muy lentos.

Los plaguicidas se encuentran en los productos vegetales en cantidades muy pequeñas, a nivel de trazas, y su determinación en alimentos es un proceso muy complejo, por lo que es importante emplear técnicas y metodologías sensibles, que maximicen la recuperación de los residuos y que permitan la extracción, separación, identificación y cuantificación de los mismos.

En Ecuador no se conocen publicaciones relacionadas a trabajos de investigación sobre residuos de pesticidas carbamatos en vegetales.

El propósito de este estudio, fue evaluar la aplicación de alternativas de extracción asistida por microondas, en la cuantificación por cromatografía liquida de residuos de carbamatos en vegetales.

Materiales y métodos

Estándares

- Aldicarb (2010 ug/mL) NSI Solutions (Estados Unidos)
- Carbofuran (1015 ug/mL) NSI Solutions (Estados Unidos)
- Methiocarb (2006 ug/mL) NSI Solutions (Estados Unidos)
- Carbaryl (1005 ug/mL) NSI Solutions (Estados Unidos)

Reactivos

- Cloruro de Sodio p.a
- Acetona para análisis ACS
- Hexano para análisis ACS
- Acetonitrilo grado HPLC
- Agua analítica grado I

Equipos

- Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC, con detector UV-Vis (SHIMADZU)
- Horno de extracción asistida Milestone (ETHOS EZ)
- Espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu 1800)
- Purificador de agua (ELGA CLASSIC)
- Bomba de vacio Roker (Chemker)
- Balanza Analítica (Mettler ToLêdo AG204
- Rotavapor (RE-2000A)

Muestras

La población del estudio, lo constituye un grupo de plantas de tomates (Lycopersicum esculentum) de las fincas de Urcuquí-Imbabura.

Se realizó un estudio en el cantón Urcuquí, provincia de Imbabura, para evaluar la contaminación de los cultivos de tomates con plaguicidas carbamatos. Las muestras se obtuvieron de diferentes fincas-haciendas-invernaderos tomateros que por confidencialidad las asignaremos como Tomatera 1, Tomatera 2, Tomatera 3 y Tomatera 4.

Las muestras de tomate se muestrearon por criticidad y se tomaron al azar 5 unidades de tomate de cada 2 guachos de siembra, en total 5 unidades de cada especie. Se almacenaron en fundas plásticas durante el transporte al laboratorio. Una vez que llegaron al laboratorio se refrigeraron a 3°C, hasta la realización del ensayo.

Extracción asistida por microondas-Purificación

La muestra de tomate se tritura en licuadora. Se pesan 2.0 g de porciones de tomate triturado y se colocan en reactores plásticos del extractor microondas, se adiciona al reactor un agitador magnético, 5 g de cloruro de sodio (absorbente de humedad) y 20 mL de acetonitrilo (solvente de extracción óptimo), acetona- hexano (1:1 v/v).

Se extraen los activos de las muestras de tomate a 60°C, a una presión aproximada de 1*106 Pa, por 10 minutos. Un volumen de 10.0 mL del extracto líquido obtenido se carga en un cartucho (C18 Restek), previamente acon-

dicionado con elución de porciones de metanol: agua. Los carbamatos eluyen con 10 mL de acetonitrilo.

El eluato recogido se evapora a 35°C en un rotavapor a sequedad. El residuo seco obtenido se reconstituye con 1 mL de acetonitrilo, se homogeniza con un vórtex. Se filtra con filtros 0,5 um y se inyecta en el cromatógrafo líquido HPLC, en las condiciones de operación óptimas.

Método de identificación y Cuantificación de carbamatos

La separación, identificación y cuantificación cromatográfica se realizan bajo las siguientes condiciones:

Condiciones de desempeño del método de identificación y cuantificación:

- Columna: Acclaim Polar Advange C18 5um 120 Aº 4.6x250 mm o equivalente.
- Elución: Isocràtica utilizando acetonitrilo / agua (45:55) (v/v).
- Flujo de la fase móvil: 1.0 mL/min.
- Detector: UV a 210 nm, a 200 nm, 221 nm, 215 nm.
- Temperatura del horno: 30°C.
- Presión: 109 psi.
- Solvente: Acetonitrilo.

Resultados y Discusión

Condiciones de desempeño del método de cuantificación

Para poder establecer las condiciones de desempeño óptimas del método analítico de identificación y cuantificación por cromatografía líquida HPLC para carbamatos, fue necesario determinar la interacción entre las variables que influyen sobre la concentración de los analitos de estudio (carbamatos), por esta razón se utilizó un diseño factorial A*B. En el que la variable independiente A corresponde al volumen de inyección y la variable independiente B corresponde a la proporción de solventes en la fase móvil. En la tabla No. 1 se indican las variables que se combinaron para evaluar su influencia sobre la respuesta cromatográfica.

Tabla 1. Variables que Influyen sobre la respuesta cromatográfica

Variables Independientes			
		B1	
A1			
(Volumen inyección)	20 uL	(Fase móvil)	Aceto/Agua (45:55)
		B2	
A2			
(Volumen inyección)	40 uL	(Fase móvil)	Aceto/Agua (15:85)

Aceto: Acetonitrilo

Se realizó un ensayo de cuantificación de carbofuran estándar de concentración conocida y se evaluaron las influencia de las variables volumen de inyección y fase móvil en la señal cromatográfica (áreas).

Del análisis de varianza para 2 factores, se obtuvo que las variables Volumen de inyección y Proporción de las fases móviles, son estadísticamente significativas al 95% de confianza, al igual que la interacción entre ambas variables, se acepta la hipótesis alternativa. Y se concluye que el volumen de inyección y las proporciones de fase móvil tienen influencia sobre la respuesta o el área cromatográfica de carbofuran.

Tabla 2. ANOVA para Arreglo Combinatorio Volumen de Inyección* Fase móvil

Source of Variation	SS	df	MS	F	F 95%
Sample	60961004874	1	60961004874	24,71	4,49
Columns	9,01173E+12	1	9,01173E+12	3652,84	4,49
Interaction	55232677531	1	55232677531	22,38	4,49
Within	39472690571	16	2467043161		
Total	9,1674E+12	19			

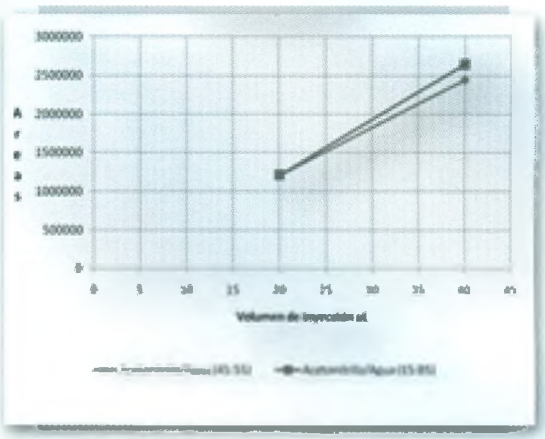


Gráfico 1. Influencia del volumen de inyección en el área cromatográfica

En el gráfico de pendientes (Gráfico 1), se demuestra que mayor respuesta, es decir mayor área cromatográfica para carbofuran, se obtiene con 40 uL de inyección y utilizando acetonitrilo/Agua (15:85), sin embargo, esta optimización no puede dejar de lado, al tiempo de retención del pico cromatográfico

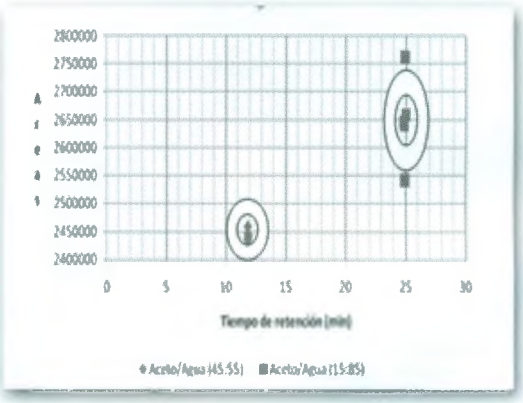


Gráfico 2. Influencia del Tiempo de Retención en la Señal Cromatográfica

En el gráfico 2 de superficies de respuesta, se demuestra que mayor respuesta, es decir mayor área cromatográfica para carbofuran, se obtiene con 40 uL de inyección y utilizando acetonitrilo/ Agua (45:55) y con 40 uL de acetonitrilo/ Agua (15:85), sin embargo en el primer caso los datos de áreas son más reproducibles y se consiguen en menor tiempo de retención que en el segundo caso. Por lo que, finalmente las condiciones óptimas serán: a) Volumen de inyección = 40 uL y b) Proporción de solventes de fase móvil = Acetonitrilo/Agua (45:55).

Condiciones de extracción asistida por microondas

Para poder establecer las condiciones de extracción óptimas para carbamatos, fue necesario determinar la interacción entre las variables de extracción que influyen sobre la concentración de los analitos de estudio (carbamatos), por esta razón se utilizó un diseño factorial A*B*C. En el que la variable A corresponde a la temperatura de extracción, la variable B corresponde al solvente de extracción y la variable C corresponde al tiempo de extracción.

En la tabla No. 3 se indican las variables que se combinaron para evaluar su influencia sobre la respuesta cromatográfica.

Tabla 3. Variables de extracción que influencian en la respuesta cromatográfica

Variables independientes					
		B1			
A1		(Solvente			
(Temp)	50°C	de Extracción)	Hexano-Acetona	C1 (Tiempo)	5 min
		B2			
A2		(Solvente			
(Temp)	60°C	de Extracción)	Acetonitrilo	C2 (Tiempo)	10 min

En este gráfico se indica que la mejor condición, refiere a la utilización de acetonitrilo como solvente y 60°C como temperatura de extracción, porque obtiene la mejor respuesta o el área más alta.

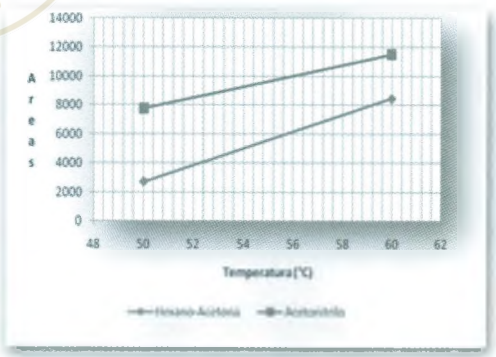


Gráfico 3. Influencia de temperatura vs. solvente de extracción

En este gráfico se indica que la mejor condición, refiere a la utilización de acetonitrilo como solvente y 60°C como temperatura de extracción, porque obtiene la mejor respuesta o el área más alta.

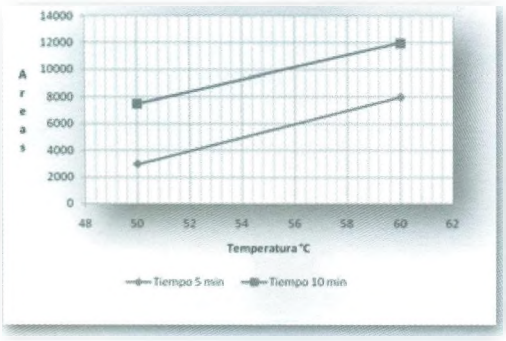


Gráfico 4. Influencia del solvente vs. tiempo de extracción

En este gráfico se sugiere que la mejor condición de extracción, es la utilización de acetonitrilo como solvente y 10 min como tiempo de extracción óptima, ya que en el gráfico, está opción tiene mayor pendiente, por tanto en el ensayo tendrá mejor respuesta y un pico cromatográfico simétrico, que es perfectamente cuantificable.

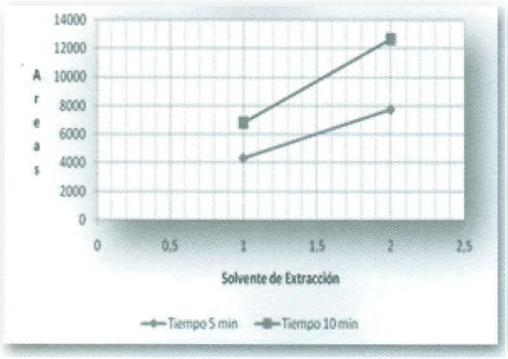


Gráfico 5. Influencia de la temperatura vs. tiempo de extracción

En este gráfico se indica que la mejor condición, refiere a la utilización de 60°C como temperatura de extracción y 10 min como tiempo de extracción, porque obtiene la mejor respuesta o el área más alta.

Se llega a la conclusión de que las mejores condiciones para la extracción, son 60°C (temperatura), acetonitrilo (solvente), 10 min (tiempo) de extracción, porque con éstas se obtiene la mejor respuesta o la mayor área para carbofuran en muestras de tomate enriquecido a 500 ug/L.

Validación del método analítico de extracción y cuantificación

Tabla 4. Objetivos de validación

PARÁMETRO	OBJETIVO ESTABLECIDO
Linealidad/ Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste r^2>=0.995
Límite de Detección del método	A determinar
Límite de Cuantificación del método	A determinar
Precisión Repetibilidad	%CV_r:<=5.0 %
Precisión Reproducibilidad	%CV_R:<=5.0 %
Incertidumbre	%U(K=2) <= 35 % en todos los niveles
Exactitud/ Recuperación	90-110%
Intervalo de trabajo	LQ-Nivel Máximo

Se indican los criterios de validación que deberán cumplir carbaryl, carbofuran, aldicarb y methiocarb en el método

analítico, para declararse como métodos validados

Tabla 5. Declaración de método validado para carbaryl

Parámetros de Validación	Criterios de aceptación	Resultado	Cumple	Observ
Linealidad/ Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste r^2>=0.990	0,999	Si	Ninguna
Límite de Detección del método	A determinar	17 ug/Kg	Si	Ninguna
Límite de Cuantificación del método	A determinar	050 ug/Kg	Si	Ninguna
Precisión Repetibilidad	%CV_r:<=5,0%	2,42 %	Si	Ninguna
Precisión Reproducibilidad	%CV_R:<=5,0%	2,42 %	Si	Ninguna
Incertidumbre	%U(K=2) <= 35 % en todos los niveles	15 %	Si	Ninguna
Exactitud/ Recuperación	90-110%	94,3 %	Si	Ninguna
Intervalo de trabajo	50 – 3000 ug/Kg	50 – 3000 ug/Kg	Si	Ninguna

El método analítico para carbaryl se declara validado.

Tabla 6. Declaración de validación del método para aldicarb

Parámetros de Validación	Criterios de aceptación	Resultado	Cumple	Observ
Linealidad/ Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste r^2>=0.990	0,995	Si	Ninguna
Límite de Detección del método	A determinar	17 ug/Kg	Si	Ninguna
Límite de Cuantificación del método	A determinar	50 ug/Kg	Si	Ninguna
Precisión Repetibilidad	%CV_r:<=5,0%	1,02 %	Si	Ninguna
Precisión Reproducibilidad	%CV_R:<=5,0%	1,21 %	Si	Ninguna
Incertidumbre	%U(K=2) <= 35 % en todos los niveles	25 %	Si	Ninguna
Exactitud/ Recuperación	90-110%	92,3 %	Si	Ninguna
Intervalo de trabajo	50 – 3000 ug/Kg	50 – 3000 ug/Kg	Si	Ninguna

El método analítico para aldicarb se declara validado.

Tabla 7. Declaración de método validado para methiocarb

Parámetros de Validación	Criterios de aceptación	Resultado	Cumple	Observ.
Linealidad/ Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste r^2>=0.990	0,997	Si	Ninguna
Límite de Detección del método	A determinar	19 ug/Kg	Si	Ninguna
Límite de Cuantificación del método	A determinar	50 ug/Kg	Si	Ninguna
Precisión Repetibilidad	$\%CV_r$:<=5,0%	1,9 %	Si	Ninguna
Precisión Reproducibilidad	$\%CV_R$:<=5,0%	2,0 %	Si	Ninguna
Incertidumbre	%U(K=2) <= 35 % en todos los niveles	31 %	Si	Ninguna
Exactitud/ Recuperación	90-110%	95,6 %	Si	Ninguna
Intervalo de trabajo	50 – 3000 ug/Kg	50 – 3000 ug/Kg	Si	Ninguna

El método analítico para methiocarb se declara validado.

Tabla 8. Declaración de método validado para carbofuran

Parámetros de Validación	Criterios de aceptación	Resultado	Cumple	Observ
Linealidad/ Función respuesta	Regresión lineal. Grado de ajuste r^2>=0.990	0,997	Si	Ninguna
Límite de Detección del método	A determinar	22 ug/Kg	Si	Ninguna
Límite de Cuantificación del método	A determinar	50 ug/Kg	Si	Ninguna
Precisión Repetibilidad	$\%CV_r$:<=5,0%	1,16 %	Si	Ninguna
Precisión Reproducibilidad	$\%CV_R$:<=5,0%	2,55 %	Si	Ninguna
Incertidumbre	%U(K=2) <= 35 % en todos los niveles	33 %	Si	Ninguna
Exactitud/ Recuperación	90-110%	96,5%	Si	Ninguna
Intervalo de trabajo	50 – 3000 ug/Kg	50 – 3000 ug/Kg	SI	Ninguna

El método analítico para carbofuran se declara validado.

3.4. Análisis de carbamatos en muestras de estudio

Se realiza la cuantificación de los principios activos utilizando previamente 2 métodos de extracción.

Tabla 9. Concentración de aldicarb por dos métodos de extracción.

Observaciones	Extracción Líquido-líquido (ug/Kg)	Extracción Microondas (ug/Kg)
1	503,5672	493,7814
2	502,9552	489,2602
3	502,3886	508,6479
4	522,4152	485,5499
5	497,4225	536,4573
6	464,6039	469,1403
7	532,4784	515,1696
8	503,5509	455,5748
9	526,6393	470,171
10	546,0806	517,3183

Se indican los resultados obtenidos del contenido de aldicarb en muestras de tomate enriquecidas a concentración 500 mg/Kg por el método de extracción líquido-líquido y extracción con microondas. El mismo tratamiento se realizó para carbofuran, carbaryl y methiocarb.

Tabla 10. Prueba t pareada para aldicarb- ambosmétodos de extracción

Media	510,21018	494,10707
Varianza	516,3537475	640,578149
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	
Estadístico t	1,794166365	NS
P(T<=t) una cola	0,116649288	
Valor crítico de t (una cola)	1,833112923	
P(T<=t) dos colas	0,233298576	
Valor crítico de t (dos colas)	2,262157158	

No existen diferencias significativas en las concentraciones de aldicarb en tomates enriquecidos tratados por los dos métodos de extracción.

Tabla 11. Concentración de carbofuran en muestras de estudio (réplica 1)

Localidad	Parcelas	Replica No 1	Peso (g)	Peso (Kg)	Conc. (ug/L)	Conc. (ug/Kg)
	PARCELA MICAELA	1003726	2,0345	0,0020	90,79	89,25
Tomatera 1	PARCELA PIETRO	846780	2,1234	0,0021	47,50	44,74
	PARCELA PIETRO	819311	2,3416	0,0023	39,92	34,10
Tomatera 2	PARCELA NEMO NETTA	832315	2,0098	0,0020	43,51	43,30
	PARCELA NEMO NETTA	829698	2,9675	0,0030	42,79	28,84
Tomatera 3	PARCELA NEMO NETTA 2	932456	2,4532	0,0025	71,13	57,99
	PARCELA NEMO NETTA 1	ND	ND	ND	ND	< 25
Tomatera 4	NEMONETA 2	ND	ND	ND	ND	< 25

Tabla 11. Concentración de carbofuran en muestras de estudio (réplica 2)

Localidad	Parcelas	Replica No.2	Peso (g)	Peso (Kg)	Conc (ug/L)	Conc (ug/Kg)
	PARCELA MICAELA	1034766	2,6764	0,0027	99,35	74,27
Tomatera 1	PARCELA PIETRO	860242	2,3213	0,0023	51,21	44,12
	PARCELA PIETRO	829127	2,0457	0,0020	42,63	41,68
Tomatera 2	PARCELA NEMO NETTA	831462	2,0765	0,0021	43,27	41,68
	PARCELA NEMO NETTA 1	829698	2,1234	0,0021	42,79	40,30
Tomatera 3	PARCELA NEMO NETTA 2	947657	2,2145	0,0022	75,32	68,03
	PARCELA NEMO NETTA 1	ND	ND	ND	ND	< 25
Tomatera 4	NEMONETA 2	ND	ND	ND	ND	< 25

Tabla 12. ANOVA Concentración de carbofuran en muestras de estudio

FUENTE VARIACION	*SC*	*GL*	*CM*	*Fcal*	*Ftab*
LOCALIDAD	1071,177569	3	357,05919	2,4089	3,28
PARCELAS	3294,557199	4	823,6393	5,5567	3,056
CONCENTRACION	258,4915024	8	32,3114378	0,2180	2,64
error	2223,37963	15	148,225309		

Las muestras de tomate, demostraron que las parcelas de cada localidad, representan a la variable más influyente en la cantidad de carbamatos cuantificados en las muestras de estudio.

Conclusiones

Las condiciones óptimas para identificar unívocamente y cuantificar aldicarb, carbofuran, carbaryl, methiocarb en tomate, por cromatografía líquida HPLC, son: flujo óptimo 0,98 mL/min; volumen de inyección: 40 uL y la proporción de fase móvil: Acetonitrilo/Agua (45:55), ya que proporcionaron respuestas cromatográficas (áreas) simétricas.

Las condiciones óptimas para extraer aldicarb, carbofuran, carbaryl, methiocarb en tomate, por extracción asistida con microondas son: temperatura de extracción 60°C, solvente de extracción acetonitrilo, tiempo de extracción 10 minutos y utilizando como agente desecante al cloruro de sodio.

El método de extracción y cuantificación de aldicarb, carbofuran, carbaryl, methiocarb en tomate, se declara validado, ya que los parámetros de linealidad, intervalo de trabajo, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud (recuperación), incertidumbre, cumplen con los objetivos de validación fijados.

El método de extracción y cuantificación para aldicarb, resultó ser lineal en el rango de 50 ug/Kg a 3.000 ug/Kg, el coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad fue de 1,02%, el obtenido para la reproducibilidad fue 1,21% y el

porcentaje de recuperación obtenido fue de 92,3%. El límite de detección del método fue 17 ug/Kg, mientras el límite de cuantificación fue de 50 ug/Kg y considerando todas las fuentes de incertidumbre, el dato obtenido fue del 25%.

El método de extracción y cuantificación para carbaryl, resultó ser lineal en el rango de 50 ug/Kg a 3.000 ug/Kg, el coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad y reproducibilidad fue de 2,42% y el porcentaje de recuperación obtenido fue de 94,2%. El límite de detección del método fue 17 ug/Kg, mientras el límite de cuantificación fue de 50 ug/Kg y considerando todas las fuentes de incertidumbre, el dato obtenido fue del 15%.

El método de extracción y cuantificación para Methiocarb, resultó ser lineal en el rango de 50 ug/Kg a 3.000 ug/Kg, el coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad fue 1,9% y el obtenido para la reproducibilidad fue de 2,0 % y el porcentaje de recuperación obtenido fue de 95,6%. El límite de detección del método fue 19 ug/Kg, mientras el límite de cuantificación fue de 50 ug/Kg y considerando todas las fuentes de incertidumbre, el dato obtenido fue del 31%.

El método de extracción y cuantificación para carbofuran, resultó ser lineal en el rango de 50 ug/Kg a 3.000 ug/Kg, el coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad fue 2,16% y el obtenido para la reproducibilidad fue de 2,5 % y el porcentaje de recuperación obtenido fue de 96,5%. El límite de detección del método fue 23 ug/Kg, mientras el límite de cuantificación fue de 50 ug/Kg y considerando todas las fuentes de incertidumbre, el dato obtenido fue del 33%.

Estadísticamente no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos por el método de extracción asistida por microondas y por el método de extracción líquido-líquido (Oficial de EPA, Environmental Protection Agency), ya que se obtuvo un valor de t calculado no significativo al 5% de t tablas, en la prueba de t, por lo que se entiende que el método alternativo de extracción es trazable al método de extracción oficial.

Los extractos obtenidos del microondas de extracción, se sometieron a procesos de limpieza con cartuchos de extracción en fase sólida (C8), para eliminar las interferencias.

En las muestras de tomate de la zona de Urcuquí-Imbabura, sometidas a estudio, se identificaron y cuantificó 1 de 4 carbamatos en estudio. Se evidenció en 3 de 4 localidades muestreadas la presencia de carbofuran, sin embargo las cantidades determinadas de estos carbamatos no sobrepasan los límites

máximos de residuos (LMRs). En la localidad Tomatera 1 para la especie Micaela y especie Pietro, se cuantificaron 89.25 ug/Kg y 44.74 ug/Kg de carbofuran respectivamente. En la localidad Tomatera 2 para la especie Pietro y Nemo Netta, se cuantificaron 34.10 ug/Kg y 43.30 ug/Kg de carbofuran respectivamente. Y en la localidad Tomatera 3 para la especie Nemo Netta se cuantificó 57.99 ug/Kg de carbofuran.

Un estudio estadístico por diseño jerárquico en las muestras de tomate, demostró que las parcelas de cada localidad, representan a la variable más influyente en la cantidad de carbamatos cuantificados en las muestras de estudio.

En definitiva, la Extracción Asistida por Microondas, es un método alternativo para la extracción de carbamatos en tomate y reemplaza a los métodos tradicionales de extracción, los cuales representan mayor manipulación, gasto de solventes y mayor tiempo de proceso.

Bibliografía

ABDERRAHIM Bouaid (2001). *Nuevos métodos para el tratamiento de muestra para la pre-concentración, estabilización y determinación de pesticidas por cromatografía de gases*, Universidad Complutense de Madrid, Dpto. de Química Analítica, pp. 345-432.

ALMEIDA M.E.W (1982). *Pesticide residue analysis as an appropriate control of good agricultural practice*, Amsterdan pp. 247-254

AZUOLA Rocio (2007). *Extracción de Sustancias Asistida por Ultrasonido (EUA), Tecnología en Marcha, Vol 20-4,* Diciembre, pp. 30 -40

BAGLIO D., Kotzias D., Larsen BR., (1999). *Atmospheric pressure ionization multiple mass spectrometric analysis of pesticides*, Jr Cromatograf. pp. 207-220.

BUSCEMA I. (2004). "Optimización en la Extracción en Fase sólida de residuos de plaguicidas organofosforados en agua potable, empleando cartuchos de carbón grafitado", *Revista Facultad Agronomía Cielo, Vol 21*, Carácas.

CASTILLO Alicia (2003). *Métodos para determinar Carbofuran (2,3-Dihidro-2,2-Dimetilbenzofuran-7-il-methil carbamato)*, AGROTECNIA No. 10, Química Orgánica y Biológica FCA-UNNE,pp. 512-536.

Castillo Jorge (2000). *Introducción a las separaciones cromatográficas*, pp. 34-68.

Codex Alimentarius a "Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas", Comisión del Codex Alimentarius, Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Roma-Italia, http://www.codexalimentarius.net

Codex Alimentarius b "Directrices sobre Buenas Prácticas en el análisis de Residuos de Plaguicidas-CAC/GL 40°C, Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias Roma-Italia, http://www.codexalimentarius.net

DEAN JR. (1998). *Extraction methods for environmental analysis*, Wiley.

DEAN JR. (2000). *Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique*, Trends in Anal. Chem 189, pp. 553, 564.

DÖMÖTÖROVA Matisová (2008). "Fast gas chromatography for pesticide residue analysis". *Journal of Chromatography A. 1207*, pp. 1-16.

(EPA 1996 a) J. Reigal, Recognition and management of pesticide poisonings environmental protection agency, Washington DC (EEUU).

(EPA 1996 b) Office of pesticide programs list of chemicals evaluated for carcinogenic potential, environmental protection agency, Washington DC (EEUU).

EURACHEM Guide (1998). The fitness for purpose of analytical methods, first internet version, this edition is copyright LGC (Teddington) Ltd. pp. 1-54.

(FAO 2002) Food and Agriculture Organization, International code of conduct on the distribution an use of pesticides, Organización de Naciones Unidas Roma, Italia.

(FAO 2003) Food and Agriculture Organization, Global Food security and the role of sustainable fertilization, Organización de Naciones Unidas Roma, Italia.

(Francesc 2007) Albert Esteve, Francesc Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas, mediante microondas y fluidos presurizados, Departamento de química analítica, Universidad de Valencia, pp. 10-215.

GARCIA L. (2003). "Where is microwave-based analytical equipment for solid simple pre-treatment going", *Trends in Analitycal Chemistry Vol 22*, No. 2,

GONZÁLES, Rosa Ma., (2007). *Presencia de Residuos Fungicidas e Insecticidas en Muestras Comerciales de Hortalizas de Hoja*, Universidad de Vigo, Departamento de Química Analítica y Alimentaria, pp. 20-50.

GONZÁLES, Rosa Ma., (2007). *Presencia de Residuos de Fungicidas e insecticidas en muestras comerciales de hortalizas en hojas*, Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Universidad de Vigo, pp. 1-131, 2007.

HARPER FD. Weisskcopf CP, and Cobb GP, (1998). *Extraction of aldicarb of metabolites from excreta and gastrointestinal tissue*. Anal Chem 70 (15), pp. 3329 – 3332.

HARRAK R. (1997). *Aplicación de los sistemas de extracción en fase sólida a la determinación de Compuestos de Interés medio ambiental: Hidrocarburos aromáticos policíclicos y naftalensulfonatos*, España.

HORWITZ Willian (2005). *Official methods of analysis of AOAC International, 18 th Edition,* Chapter 10, pp. 41-46.

LUIGI Buldini (2002). Recent applications of sample preparation techniques in food Analysis, *Journal of Chromatography A,* 975 pp. 47–70.

MOCHOLÍ F. (2001). "Nuevas tendencias en el análisis de multirresiduos de plaguicidas en vegetales mediante GC/MS y GC/MS/MS". *Phytoma España*: *La revista profesional de sanidad vegeta*l, pp. 129, 33-35.

NO BREGA Joaquim (2002). Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation, *Spectrochimica* Acta Part B 57, pp. 1855–1876.

PASQUEL Anthonio (2001). Extracción de Fluídos Presurizados, *Rev. Amazónica de Investigación alimenticia, Vol 1*, pp. 9-14.

RAMIREZ Lucia (2009). *Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases espectrometría de masa/masa*, Universidad Tecnológica de Mixteca, pp. 32, 40.

SKOOG West (2001). *Fundamentos de química analítica*, España, 4ta. Ed. Reverté S. A.

SOLETO José Luis (2003). Procesos con fluidos Supercríticos, España, *Anales de la Real Sociedad Española de Química,* pp. 15-16.

STEINHEIMER T.M. (2000). Soil and sediments; pesticides content sampling, sample preparation and preservation. In *Encyclopedia of Analytical Chemestry Application, Theory and instrumentation*, vol 8, edited by R.A, Meyers, UK, pp. 6565 – 6582.

Valverde Antonio (20o0). *Extracción con fluidos supercrítico: Principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*, pp 1-14

Villemur Ma. Silvin (2000). *Determinación de Pesticidas organoclorados en suelos por extracción con microondas,* Programa de química analítica.

VIM (2000) Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms

VIM (3rd edition). JCGM 2000:2008.

WERNER S.L., Johnson S.M. (1994). Method of analysis by the U.S geological survey national water quality laboratory determination of selected carbamate pesticides in water by high performance liquid chromatography. *U.S Geological Survey.* Open file report pp. 93-650.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FUNDADA EN 1620
QUITO