

EVALUACIÓN DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS BENOMIL Y CARBENDAZIM EN EL
PROCESO DE CONSERVACIÓN DE LA ARVEJA MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC.

ANDREINA SAMPER GUERRERO
FABIAN ESTEBAN ROSERO NARVAEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2019

EVALUACIÓN DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS BENOMIL Y CARBENDAZIM EN EL
PROCESO DE CONSERVACIÓN DE LA ARVEJA MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC.

ANDREINA SAMPER GUERRERO
FABIAN ESTEBAN ROSERO NARVAEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Químico

DIRECTOR
JUAN JOSÉ LOZADA CASTRO
Ph.D Química Analítica

Co-DIRECTOR
OSWALDO OSORIO MORA
Ph.D Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO

2019

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN:

JUAN JOSÉ LOZADA CASTRO

Director

OSWALDO OSORIO MORA

Co-director

JUAN CAMILO VARGAS GALLEGU

Jurado

CLANDER JAVIER ESTRADA

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre 25 de 2019.

DEDICATORIA

Al Creador del todo y la nada, por darnos la energía necesaria para permitirnos llegar a este momento tan especial.

A nuestros padres, por habernos apoyado en todo momento, por sus consejos, por su crianza, por creer en nosotros y por su amor incondicional, pues sin ellos no habiéramos logrado esta meta en nuestra vida profesional.

A nuestros hermanos y familiares por cada momento en el que nos apoyaron y motivaron a seguir adelante.

A nuestros amigos por cada sonrisa y por permitirnos aprender más de la vida a su lado.

¡Esto es posible gracias a todos ustedes!

Andreina Samper y Esteban Rosero

AGRADECIMIENTOS

Este nuevo logro es en gran parte gracias a ustedes; hemos logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio podría parecer tarea interminable, quisiéramos dedicar nuestra tesis a ustedes: A Dios por llenarnos de fortaleza en los momentos más difíciles y por guiarnos hacia conseguir esta meta.

A nuestros padres, hermanos y familiares por ser la motivación diaria que nos impulsó siempre a seguir adelante.

A nuestro director de tesis, Dr. Juan José Lozada por su confianza, orientación y apoyo en el desarrollo de nuestro proceso de investigación y su grupo de investigación GIESIC que fue el hogar de nuestro proyecto.

A nuestro Co-Director Oswaldo Osorio Mora por toda su colaboración y por abrirnos las puertas de su grupo de investigación GAIDA y laboratorio.

A nuestros Jurados evaluadores el MSc. Juan Camilo Vargas y el químico Clander Estrada por su tiempo, sus aportes y colaboración.

A David Arturo por siempre ayudarnos y compartirnos su conocimiento.

A la Universidad de Nariño, a nuestros profesores del Departamento de Química por sus ganas de transmitirnos sus conocimientos y dedicación gracias a ellos hemos logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de nuestra tesis, a Carito Luna por ser la mejor secretaria y su disposición para siempre colaborarnos.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por toda su colaboración, especialmente a Juan Pablo Torres y Jessica Basante, encargada del Laboratorio de Cromatografía.

A nuestro grupo de amigos y a esas personitas especiales que siempre nos acompañaron en este camino Lore, Esteban, Vicky, Rubén y Fer. Gracias por cada momento compartido durante todos estos años, son simplemente únicos.

A nuestros amigos y compañeros de la universidad Estefanía Carrera, Natalia Solarte, Natalia Delgado y Jenny Muñoz. Así mismo a todos los integrantes del GIESIC por su compañerismo y colaboración.

¡A todos muchas gracias por su incondicional apoyo, siempre los guardaremos en nuestras almas!

RESUMEN

Los pesticidas han beneficiado e incrementado la producción agrícola combatiendo diversas plagas; no obstante su uso de manera continua y descontrolada hace que se produzcan efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente. En Colombia, la arveja se encuentra entre los productos hortícolas más consumidos; sin embargo, no se ha determinado la presencia de residuos de fungicidas en su proceso de conservación, lo cual es necesario para que pueda ser comercializada.

En este trabajo se validó una metodología para la determinación de residuos de los fungicidas Benomil y Carbendazim que son los más utilizados por los agricultores en Nariño, en arvejas de dos variedades San Isidro y Alcalá, frescas y procesadas en la Planta piloto de la Universidad de Nariño, provenientes de la exprovincia de Obando (Nariño), analizada mediante HPLC-PDA en fase reversa. Los residuos de Benomil se determinaron luego de su conversión a Carbendazim. La extracción y limpieza de los residuos de las muestras se realizó con la técnica QuEChERS. La metodología demostró ser selectiva, precisa y exacta. Las curvas de calibración son lineales en un rango de concentración de 0.01 a 5.00 mg/L con límite de detección de 0.0021 mg/L y límite de cuantificación de 0.0026 mg/L para Carbendazim total. Los porcentajes de recuperación tienen un promedio 95%.

Se valoraron los niveles de Carbendazim total en las muestras de los dos tipos de arveja, obteniéndose valores, antes del procesamiento de 0.56 y 0.22 mg/L y después de su procesamiento de 0.010 y 0.004 mg/L en san Isidro y Alcalá respectivamente, los resultados después del procesamiento estuvieron por debajo de los LMR. Finalmente mediante la técnica UHPLC-MS se confirmó la ausencia de productos de transformación de Carbendazim y no se encontraron residuos de estos compuestos, en muestras recolectadas en la exprovincia de Obando, Nariño, haciendo viable su comercialización.

Palabras clave: fungicidas, arveja, validación, enlatado, HPLC.

ABSTRACT

Pesticides have benefited and increased agricultural production by fighting various pests; Despite its continuous and uncontrolled use, it causes negative effects on health and the environment. In Colombia, peas are among the most consumed horticultural products; however, the presence of fungicide residues in its conservation process has not been determined, which is necessary for it to be commercialized.

This work validated a methodology for the determination of residues of the fungicides Benomil and Carbendazim that are the most used by farmers in Nariño, in peas of two varieties San Isidro and Alcalá, fresh and processed in the Pilot Plant of the University of Nariño, from the exprovincia of Obando (Nariño), analyzed by reverse phase HPLC-PDA. Benomil residues were determined after conversion to Carbendazim. The extraction and cleaning of the sample residues was carried out with the QuEChERS technique. The methodology proved to be selective, precise and accurate. The calibration curves are linear in a concentration range of 0.01 to 5.00 mg / L with a detection limit of 0.0021 mg / L and a quantification limit of 0.0026 mg / L for total Carbendazim. Recovery rates average 95%.

The levels of total Carbendazim in the samples of the two types of peas were assessed, obtaining values, before processing 0.56 and 0.22 mg / L and after processing 0.010 and 0.004 mg / L in San Isidro and Alcalá respectively, results after processing were below the LMR. Finally, through the UHPLC-MS technique, the absence of Carbendazim transformation products was confirmed and no residues of these compounds were found in samples collected in the exprovincia of Obando, Nariño, making their commercialization viable.

Keywords: fungicides, peas, validation, canning, HPLC.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	23
OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
ESTADO DEL ARTE.....	27
3.1 MARCO TEÓRICO.....	27
3.1.1 Marco contextual.	27
3.1.1.1 áreas de estudio.	27
3.1.1.2 generalidades de la arveja (<i>Pisum sativum</i> L.).....	28
3.1.2 Descripción de las variedades.	30
3.1.2.1 <i>Pisum sativum</i> L. variedad (Obonuco San Isidro).....	30
3.1.2.2 <i>Pisum sativum</i> L. variedad (Alcalá).....	30
3.1.3 Plaguicidas.	31
3.1.3.1 clases de plaguicidas.	31
3.1.3.2 los plaguicidas y alimentos	32
3.1.3.3 los plaguicidas y el medio ambiente	33
3.1.3.4 residuos de plaguicidas.	34
3.1.3.5 plaguicidas usados en el departamento de Nariño en el cultivo de arveja.....	34
3.1.4 Características del hongo <i>ascochyta</i> :.....	37
3.1.5 Fungicidas de estudio.....	38
3.1.5.1 Benomil (BEH).	38
3.1.5.2 Carbendazim (MBC):.....	39
3.1.6 Productos de degradación del Benomil y Carbendazim.	40
3.1.7 Métodos de tratamiento de la muestra	41

3.1.8 Determinación de Benzimidazoles (Carbendazim y Benomil) y sus productos.....	42
3.1.8.1 análisis de residualidad de pesticidas en alimentos.	42
3.1.8.2 método QuEChERS.	42
3.1.8.3 métodos de análisis: cromatografía líquida.....	43
3.1.9 Tratamiento estadístico de los datos	47
3.1.9.1 análisis de varianza.	47
3.1.10 Validación de metodologías analíticas por HPLC	48
3.1.10.1 selectividad.	49
3.1.10.2 idoneidad del sistema (parámetros cromatográficos).	49
3.1.10.3 límites de detección y cuantificación.....	51
3.1.10.4 linealidad.....	51
3.1.10.5 precisión.....	52
3.1.10.6 exactitud.....	52
3.1.11 Conservación de productos alimenticios.	54
3.2 ANTECEDENTES	54
MATERIALES Y METODOS.....	58
4.1 REACTIVOS	58
4.1.1 Estándares	58
4.1.2 Disolventes.....	58
4.1.3 Otros reactivos	58
4.2 EQUIPOS Y MATERIALES	59
4.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector PDA (HPLC-PDA).....	59
4.2.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS).....	59
4.2.3 Otros equipos.	59

4.2.4 Materiales.....	59
4.3 MUESTREO.....	60
4.3.1 Selección de unidades de muestreo.....	60
4.3.2 Origen de las muestras.....	61
4.3.3 Muestra analítica.....	62
4.4 PROCEDIMIENTOS.....	62
4.4.1 Preparación de estándares.....	62
4.4.1.1 Soluciones madre de BEH y MBC a 100 µg/mL:.....	62
4.4.2 Preparación de muestras para la determinación de BEH y MBC con la técnica QuEChERS.....	63
4.4.2.1 preparación de muestras.....	63
4.4.2.2 extracción.....	64
4.4.2.3 preparación de extracto de arveja (blanco matriz).....	66
4.4.2.4 preparación de extracto de la vaina de arveja.....	67
4.4.2.5 características sobre los fungicidas comerciales.....	67
4.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE HPLC-PDA.....	67
4.5.1 Condiciones cromatográficas:.....	67
4.5.2 Selectividad:.....	70
4.5.2.1 hidrolisis ácida.....	70
4.5.2.2 evaluación de excipientes.....	70
4.5.2.3 evaluación del efecto matriz.....	70
4.5.3 Efecto del pH y la temperatura en matriz fortificada con estándares de los fungicidas.....	71
4.5.3.1 efecto del pH.....	71
4.5.3.2 efecto de la temperatura.....	71
4.5.4 Linealidad.....	71

4.5.4.1 linealidad del sistema.....	71
4.5.4.2 linealidad del método.....	72
4.5.5 Límites de detección y cuantificación:	72
4.5.6 Precisión.....	73
4.5.6.1 repetibilidad del sistema.	73
4.5.6.2 repetibilidad del método.	73
4.5.6.3 reproducibilidad del método.	74
4.5.7 Exactitud.	74
4.6 PROCESAMIENTO EN LA PLANTA PILOTO	74
4.6.1 Recolección de las muestras.	74
4.6.2 Proceso de conservación de la arveja.....	75
4.7 ANÁLISIS DE LOS FUNGICIDAS POR UHPLC-MS	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
5.1 ANÁLISIS DE CARBENDAZIM Y BENOMIL MEDIANTE HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA.....	76
5.1.1 Espectros UV-vis.	76
5.1.2 Identificación de los compuestos MBC y BEH mediante HPLC con estándares.....	77
5.1.3 Idoneidad del sistema.....	77
5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	78
5.2.1 Selectividad.....	78
5.2.1.1 blanco de solvente.....	79
5.2.1.2 hidrolisis ácida.	79
5.2.1.3 evaluación de los excipientes.....	81
5.2.1.4 evaluación del efecto matriz.	82
5.2.2 Efecto del pH y la temperatura en estándares de los fungicidas.....	82

5.2.2.1 efectos del pH.	83
5.2.2.2 efectos de la temperatura.	84
5.2.3 Linealidad.	85
5.2.3.1 linealidad del sistema.	85
5.2.3.1 linealidad del método.	88
5.2.4. Límites de detección y cuantificación.	91
5.2.5 Precisión.	92
5.2.5.1 repetibilidad del sistema.	92
5.2.5.2 precisión del método.	92
5.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS.	97
5.3.1 Procesamiento en planta piloto.	97
5.3.2 Cuantificación de fungicidas en las 2 variedades.	100
5.4 ANÁLISIS DE LOS FUNGICIDAS Y PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN MEDIANTE UHPLC-ORBITRAP-MS	104
CONCLUSIONES	111
RECOMENDACIONES.	113
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	114
ANEXOS	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización de la subregión de la exprovincia de Obando, Nariño, Colombia.	28
Figura 2. Arveja afectada con el hongo	37
Figura 3. Estructura química del Benomil	38
Figura 4. Estructura química del Carbendazim.....	39
Figura 5. Mecanismos de transformación de BEH a MBC	40
Figura 6. Rutas de degradación de Benomil bajo distintas condiciones.....	41
Figura 7. Componentes de un Cromatógrafo Líquido (HPLC).	46
Figura 8. Cromatograma de Carbendazim	56
Figura 9. Espectro UV Carbendazim.....	56
Figura 10. Ubicación de la Exprovincia de Obando	61
Figura 11. Trituración y homogenización de muestra	64
Figura 12. Tratamiento térmico para conversión de BEH en MBC	64
Figura 13. Muestras en tubos de centrifuga con Acetonitrilo.....	65
Figura 14. Tubo QuEChERS y muestra antes de la centrifugación.....	65
Figura 15. Muestra después de la extracción QuEChERS.....	66
Figura 16. Extractos de arveja.	66
Figura 17. Espectros UV-vis de MBC (rojo) y BEH (azul).....	77
Figura 18. Cromatograma de una mezcla de estándares de MBC y BEH mediante HPLC-UV, 5 mg/L a λ 285 nm.....	77
Figura 19. Cromatograma de blanco de Acetonitrilo. Detección 285nm	79
Figura 20. Cromatograma de Carbendazim a 1mg/L y luego acidificada. Detección a 285 nm..	80
Figura 21. Comparación de cromatogramas de soluciones de Benomil acidificadas. Detección a 285 nm	80
Figura 22. Confirmación de transformación BEH a MBC	81

Figura 23. Espectros UV de la hidrolisis. Rojo (MBC) azul señal cercana a (BEH)..	81
Figura 24. Cromatograma de señales de los excipientes en producto comercial de MBC. Detección a 285 nm	82
Figura 25. Cromatograma de señales cercanas a MBC en extracto de muestras de arveja, Detección 285 nm	82
Figura 26. Cromatograma pH nivel bajo mezcla MBC + BEH.	83
Figura 27. Cromatograma de temperatura nivel bajo, mezcla MBC + BEH.	85
Figura 28. Cromatograma de temperatura nivel alto, mezcla MBC + BEH.	85
Figura 29. Curva de calibración del estándar Carbendazim	86
Figura 30. Curva de calibración del método	90
Figura 31. Grano de arveja de las variedades Alcalá y San Isidro	98
Figura 32. Lavado manual de las muestras con agua.	98
Figura 33. Muestras de arveja durante y después del tratamiento de escaldado.	99
Figura 34. Muestras de arveja durante el tratamiento de enlatado	100
Figura 35. Muestras de arveja antes y después del enlatado.	100
Figura 36. Cromatogramas de los extractos según sus tratamientos variedad San Isidro	101
Figura 37. Cromatogramas de los extractos según sus tratamientos variedad Alcalá.	102
Figura 38. Cromatograma del extracto de las vainas de arveja.	103
Figura 39. Ruta de degradación de BEH y MBC.	104
Figura 40. Mecanismo de transformación de MBC a 2-AB	105
Figura 41. Cromatogramas UHPLC-MS de extractos de arveja de la variedad san Isidro y estándar de MBC.	106
Figura 42. Espectro de masas del estándar de Carbendazim por UHPLC-MS ESI+.	108
Figura 43. Espectro de masas del extracto de arveja sometido a T ₁ por UHPLC-MS ESI+.	108
Figura 44. Espectro de masas del extracto de arveja sometido a T ₂ por UHPLC-MS ESI+.	109
Figura 45. Mecanismo de fragmentaciones típicas del Carbendazim.	109

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la arveja.	29
Tabla 2. Información nutricional de la arveja por 100 g de producto comestible.	29
Tabla 3. Clasificación según su acción específica.	32
Tabla 4. Fungicidas usados en arveja, grupo químico al que pertenecen.	35
Tabla 5. Información sobre el producto comercial y la dosis de los plaguicidas utilizados en arveja.....	35
Tabla 6. Principales metabolitos, persistencia y efectos sobre la salud de los plaguicidas utilizados en arveja	36
Tabla 7. Propiedades físico-químicas del Benomil y el Carbendazim	39
Tabla 8. Ítems para la validación y sus criterios de aceptación	53
Tabla 9. Datos para la preparación de los estándares de BEH y MBC.....	63
Tabla 10. Información sobre las sustancias activas BEH y MBC.	67
Tabla 11. Criterios de aceptación de idoneidad del sistema	68
Tabla 12. Gradiente de fase móvil	69
Tabla 13. Parámetros instrumentales para HPLC	69
Tabla 14. Datos de idoneidad del sistema para MBC.....	78
Tabla 15. Efecto del pH en el MBC.....	83
Tabla 16. Efecto de la temperatura en el MBC.....	84
Tabla 17. Datos de linealidad del sistema.....	85
Tabla 18. Prueba t de Student para la linealidad del sistema.....	87
Tabla 19. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del sistema..	87
Tabla 20. Prueba G de Cochran..	88
Tabla 21. Datos de linealidad del método.....	88
Tabla 22. Prueba t de Student para la linealidad del método.....	90

Tabla 23. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del método.	90
Tabla 24. Evaluación de LOD y LOQ por calibrado.	92
Tabla 25. Repetibilidad del método	93
Tabla 26. Reproducibilidad del método, precisión intermedia.....	93
Tabla 27 Prueba F de Fisher y ANOVA para la precisión intermedia.	94
Tabla 28. Determinación de %RSD intra e interdía	94
Tabla 29. Datos de la exactitud.....	95
Tabla 30. Prueba T de student para exactitud.....	96
Tabla 31. Prueba G de Cochran para exactitud.....	96
Tabla 32. Cuantificación de MBC total en variedad San Isidro..	100
Tabla 33. Cuantificación de MBC total en variedad Alcalá..	101
Tabla 34. Cuantificación de MBC total en las vainas de las dos variedades.	103
Tabla 35. Nivel mínimo de cuantificación (NMC), tiempo de retención (t_R) y concentración del Carbendazim presente en los extractos de arveja..	105
Tabla 36. Masa exacta de Carbendazim protonado y sus principales productos iónicos, fragmentaciones típicas del Carbendazim..	107

LISTA DE ANEXOS

Anexo A selectividad.....	119
Anexo B. Productos comerciales de BEH y MBC	124
Anexo C.1 Regresión simple, ANOVA y T-student para linealidad del sistema.....	125
Anexo C.2 Regresión simple, ANOVA y T-student para linealidad del método.....	127
Anexo D. Prueba G de Cochran para linealidad del sistema	129
Anexo E. %RSD áreas y t_R para linealidad.....	130
Anexo F. Prueba F de Fisher y ANOVA para precisión intermedia del método.....	131
Anexo G. efectos de pH y temperatura en los fungicidas.....	133
Anexo H. Cuantificación de pesticidas en muestras.....	137
Anexo I. Curva de calibración de MBC para análisis de Vaina y etiquetas de productos comerciales.	149
Anexo J. Certificado de los estándares	150
Anexo K. condiciones cromatográficas	152

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Analysis of variance (análisis de varianza)
AOAC	Association of official analytical chemists (asociación de Químicos para la excelencia analítica)
BEH	Benomil
BPA	Buenas prácticas agrícolas
BUB	2-(3-butiraldehido) benzimidazol
CLEAN UP	Proceso de limpieza de las muestras
<i>codex</i>	Comisión creada por la FAO y la OMS para desarrollar normas Alimentarias
C ₁₈	Octadecilsilano
DL ₅₀	Dosis letal 50
FAO	Organización de las naciones unidas para agricultura y la alimentación
FRAC	fungicide resistance action committee (comité de acción de resistencia a fungicidas)
F _{cal}	Valor de Fisher calculado
F _{tab}	Valor de Fisher contenido en las tablas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
H ₀	Hipótesis nula.
H ₁	Hipótesis alternativa.
ICA	Instituto colombiano agropecuario
LMR	Límites máximos de residuos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MBC	Carbendazim

mg/L	Miligramos de soluto sobre litros de solución (partes por millón)
ml/min	Militros de fase móvil que transcurren en un minuto
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
mv/s	Milivoltios sobre segundos
<i>m/z</i>	Relación masa/ carga
nm	Nanómetros
PDA	Detector de matriz de fotodiodos
pH	Potencial de hidrogeno
QuEChERS	Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Relative standard deviation (desviación estándar relativa)
R ²	Coefficiente de determinación
STB	(3-butyl-1,3,5-triazino[1,2a]-benzimidazol-2,4 (1H,3H) diona)
T _r	Tiempos de retención
T ₀	Tratamiento cero, lavado manual.
T ₁	Tratamiento uno, lavado + escaldado.
T ₂	Tratamiento dos, lavado + escaldado + enlatado.
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas
Uv-vis	Detector ultravioleta-visible
2-AB	2-aminobenzimidazole
Λ	Longitud de onda
μl	Unidad microlitro

GLOSARIO

Analito: Sustancia contenida en la muestra sometida a análisis, en algunos casos se lo conoce como Principio activo. (A.E.F.I., 2001)

Ascochyta: Es un hongo necrotrófico, taxonómicamente pertenece a la familia Fungí > Ascomycota > Pezizomycotina > Dothideomycetes > Pleosporales > Didymellaceae. La sintomatología que presenta es pequeñas manchas necróticas marron, hendidas, esféricas y delimitadas por un halo oscuro, en hojas, tallos y vainas. Estas lesiones son circulares alargadas en hojas, tallos y vainas. En estas lesiones se forman numerosos picnidos. Epidemiológicamente el patógeno sobrevive en rastrojos y semillas. (Carmona & Sautua, 2017)

Benzimidazoles: Son hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, caracterizados por la fusión de benceno e imidazol, utilizados ampliamente en agricultura como fungicidas por ejemplo: Benomil, carbendazim, metil tiofanato, tiabendazol, fuberidazol. Inhiben la síntesis de la tubulina, el sitio de acción es un aminoácido de la β -tubulina. (Tecnoagricola, 2015)

Blanco: Mezcla homogénea que contiene todos los componentes de la matriz excepto el analito o principio activo. (A.E.F.I., 2001)

Codex alimentarius: o “Código Alimentario”, es un conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas aprobados por la Comisión del *codex alimentarius*. La Comisión, conocida también como CAC, constituye el elemento central del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias y fue establecida por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS) con la finalidad de proteger la salud de los consumidores y promover prácticas leales en el comercio alimentario. (FAO, 2012)

Coefficiente de variación o desviación estándar relativa: Es la desviación estándar expresada como función de la media, normalmente se expresa en porcentaje. (A.E.F.I., 2001)

Desviación estándar: Estadístico básico indicativo de la dispersión o variabilidad de los datos. (A.E.F.I., 2001)

Estándar de referencia: Es un material o sustancia homogéneo con propiedades específicas que ha sido analizado y certificado por un organismo calificado y homologado, y pueden ser usadas para la calibración de un aparato, la evaluación de un método de medida, o para asignar valores a un material. A su vez estos materiales deben contar con un certificado que establece claramente sus propiedades y su trazabilidad. (A.E.F.I., 2001)

Exhausting: Técnica que tiene por objetivo fundamental la eliminación del aire disuelto en el producto en conjunto con el oxígeno y la formación de un ulterior vacío. (Alvarado et al., 2009)

Fitosanitario: Los productos fitosanitarios también llamados agroquímicos, son sustancias que protegen la sanidad de las plantas, y con ello nuestros alimentos. Pueden ser de origen biológico o de síntesis química. Permiten impedir el daño que las plagas pueden causar a los cultivos, y por lo tanto, afectar el rendimiento y la calidad de la producción. (ICA, 2016)

Fungicida: Clase de plaguicida que se usa exclusivamente para controlar hongos causantes de enfermedades, los fungicidas translaminares y sistémicos pueden penetrar el tejido de las plantas y matar el hongo que ha invadido el tejido, y por eso se denominan “curativos”. (FAO, 2012)

Hilum: (de la semilla) La cicatriz dejada por la separación del funículo cuando la semilla madura. Se halla adjunto a la punta de la radícula. (FAO, 2012)

Metabolitos: Los metabolitos se forman por las reacciones químicas que se producen vía el metabolismo de la planta, plagas o suelo. Ciertas materias activas se degradan total o parcialmente en otra molécula llamada "metabolito". (Phytocontrol, 2018)

Productos de degradación: Posibles compuestos (identificables o no) que se pueden formar a partir de la molécula original del principio activo o de un excipiente determinado por efecto de factores fisicoquímicos.

Test de idoneidad del sistema: Son una serie de pruebas o parámetros que se establecen sobre el sistema analítico completo y específico de manera periódica o inmediatamente antes de aplicar el análisis para asegurar que este se mantiene estable y adecuado con el tiempo. (ICH, 2005)

INTRODUCCION

En el Departamento de Nariño el sector agropecuario es la base del sustento económico, con una gran diversidad de productos como papa, cebada, trigo, etc., pero es la arveja uno de los productos que ha adquirido mayor importancia en muchas regiones del sur del departamento y en específico las zonas que comprenden la exprovincia de Obando, por su influencia, no solo en el mejoramiento del suelo, calidad de la dieta alimenticia, si no también, por que se ha convertido en un producto de gran importancia económica para los agricultores de la región. Sin embargo, después de la cosecha los productos tienen un tiempo de vida útil muy corto (de 7 a 10 días sin refrigeración), por la acción de procesos fisiológicos propios de su desarrollo y frecuentemente por la aparición de tres especies de hongos que pertenecen al género *Ascochyta* (*Ascochyta pisi*, *Ascochyta pinodes* y *Ascochyta pinodella*) (Valencia, Timaná, & Checa, 2010).

Para reducir el deterioro de los productos agrícolas por procesos fisiológicos, es necesario recurrir a métodos de preservación; los métodos más utilizados para este tipo de hortaliza son el enlatado y conservación con empaques plásticos, métodos que protegen y preservan las características favorables de los productos y presentan grandes ventajas adicionales como disponibilidad en épocas fuera de cosecha, fácil manipulación, manejo, transporte y almacenamiento del producto por largo tiempo inclusive a temperatura ambiente (Helen., 2000).

Por otra parte, en Nariño, para combatir el deterioro de las arvejas causado por la presencia de hongos, se utilizan principalmente los fungicidas: **Benomil y Carbendazim**, los cuales se aplican desde el tratamiento de la semilla de manera preventiva hasta terminada la cosecha. Estos fungicidas benzimidazólicos, son muy utilizados por su acción fungicida en el control fitosanitario debido a que por ser de acción sistémica, entran en los tejidos vasculares de la planta a través del follaje o las raíces, y son trasladados por medio de la savia a las diferentes partes de la planta en donde actúan inhibiendo la biosíntesis de ergosterol (Enriquez, 1999).

Los efectos indeseables para la salud de estos fungicidas, dependen del grupo activo, la dosis, la vía, el tiempo de exposición y van desde efectos agudos como vómitos, irritaciones, abortos y coma, cuando la exposición es en cortos periodos de tiempo; y crónicos, como cáncer, malformaciones, etc., cuando la exposición es en largos periodos de tiempo, finalmente en ambos casos puede conllevar hasta la muerte. (Márquez Delgado, 2008).

El uso indiscriminado de plaguicidas como el Carbendazim pueden contaminar también los suelos, fuentes hídricas y vegetales, afectando a los organismos que hacen parte de esos ecosistemas

principalmente aves y abejas, además de influir en los microorganismos favorables del suelo conllevando al aumento del número de plagas en los cultivos y posibilitando su resistencia. En muchos casos, los pasos iniciales en el proceso como lavado y limpieza del producto con frecuencia reducen la cantidad de residuos de plaguicidas, sobre todo los no sistémicos. Sin embargo, algunos metabolitos y productos de degradación de interés toxicológico, persisten en los alimentos procesados (FAO, 2012).

Nariño en el año 2017 presentó un porcentaje de producción de arveja de 55,2% a nivel nacional equivalente a 48.264 toneladas anuales, siendo el principal productor en Colombia según el departamento administrativo nacional de estadística (DANE, 2019), a pesar de ello, tiene un incipiente manejo post cosecha del producto, lo cual ha ocasionado en algunas oportunidades pérdidas hasta de un 42.1% del total del producto cosechado (Ramírez Milla, 2009).

Para mitigar estas pérdidas en la Universidad de Nariño, se está evaluando opciones de agroindustrialización de la arveja, entre algunas de ellas el enlatado, ya que es un procedimiento adecuado que protege y preserva las características favorables de los alimentos, no obstante, para que este producto tenga un mercado viable, la cantidad de fungicidas o metabolitos contenidos deben estar por debajo de los lineamientos exigidos por el *codex alimentarius*, que define el límite máximo de residuos (LMR) como “la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/L)” permitiendo así el consumo humano (Codex alimentarius, 2013).

El análisis de alimentos antes y después de procesados busca demostrar que pueden llegar a existir contenidos apreciables de Benzimidazoles o sus productos de descomposición los cuales son nocivos para la salud humana, siendo un referente para que los consumidores conozcan que muchos de los fungicidas o sus metabolitos logran persistir en los alimentos y pueden afectar la salud de los consumidores directamente o a largo plazo (Alder, L. & Hill, 1988)

En este orden de ideas, para que la arveja en conserva procesada en el departamento de Nariño, llegue al consumidor de manera segura y cumpla con las normas para su comercialización, se deben realizar la evaluación y seguimiento de los residuos fitosanitarios en el proceso y producto, con los resultados obtenidos se podrían proponer ajustes a las prácticas de cultivo y procesamiento. Con el fin de proponer ajustes a los procedimientos de aplicación, para fomentar las buenas prácticas agrícolas (BPA) y de esta manera ser una base para que los agricultores puedan optar por un cambio en el tratamiento fitotóxico de las especies en estudio para disminuir el impacto ambiental y sanitario.

Los métodos espectrofotométricos fueron los primeros utilizados para determinar benzimidazoles, estos los identifican y cuantifican en soluciones acuosas y orgánicas a 286 nm. (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008).

Estudios se han enfocado en establecer la cinética y los mecanismos de conversión del benomil a sus productos de degradación, entre ellos su metabolito más estable, el carbendazim, concluyendo que esta degradación se da muy fácilmente en la mayoría de los solventes por medio de una reacción de catálisis intramolecular espontánea. (Chiba, M.; Cherniak, 1978).

En este estudio se validó una metodología analítica para determinar residuos de benzimidazoles en arvejas en concentraciones inferiores a sus Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en el *codex alimentarius*, para su aplicación en el análisis de muestras recolectadas en algunos municipios de Nariño. El método aprovecha una técnica novedosa y amigable con el medio ambiente como los QuEChERS para lograr una extracción y limpieza efectiva de la muestra previa a su determinación analítica por HPLC-PDA.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis diagnóstico de residualidad de Benzimidazoles Benomil y Carbendazim utilizando la técnica HPLC, en muestras de arveja en diferentes momentos del proceso de conservación de dos variedades de arveja San Isidro y Alcalá, provenientes del municipio de Ipiales - Nariño.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método cromatográfico para determinar residuos de Benomil, Carbendazim y sus productos de transformación.
- Extraer residuos de los fungicidas Benomil y Carbendazim en la arveja de las variedades San Isidro y Alcalá, frescas y En diferentes momentos del proceso industrial de la arveja (lavado, escaldado y enlatado).
- Valorar los niveles de Benomil, Carbendazim y sus productos de transformación en las muestras de los dos tipos de arveja con los límites permisibles según el reglamento CEE Regulación 1107/2009 (91/414).
- Determinar los productos de transformación del Benomil y Carbendazim en las muestras de arveja en conserva, mediante HPLC-MS.

ESTADO DEL ARTE

3.1 MARCO TEÓRICO

3.1.1 Marco contextual.

3.1.1.1 áreas de estudio.

La exprovincia de Obando: Es una de las 13 subregiones del departamento colombiano de Nariño, se compone por la mayoría de los municipios productores de arveja del departamento, Comprende municipios como:

- Aldana (población: 6085 hab, a 3.013 m.s.n.m.)
- Contadero (población: 6954 hab, a 2475 m.s.n.m.)
- Córdoba (población: 14 006 hab, a 2867 m.s.n.m.)
- Cumbal (población: 37635 hab, a 3050 m.s.n.m.)
- Guachucal (población: 15652 hab, a 3180 m.s.n.m.)
- Gualmatán (población: 5767 hab, a 2830 m.s.n.m.)
- Ipiales (población: 145073 hab, a 2900 m.s.n.m.)
- Puerres (población: 8384 hab, a 2817 m.s.n.m.)
- Pupiales (población: 19388 hab, a 3014 m.s.n.m.)

En total son 13 municipios que abarcan 4.894 kilómetros cuadrados.

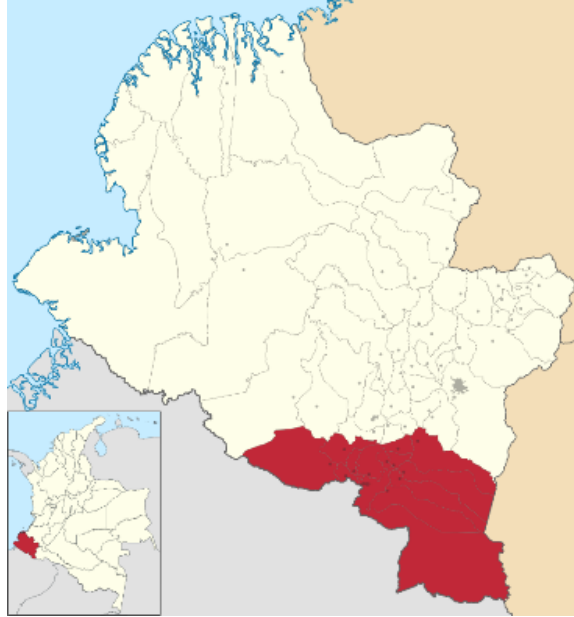


Figura 1. Localización de la subregión de la exprovincia de Obando, Nariño, Colombia.

Fuente: tomado de (Gobernación de Nariño, 2016)

De estos municipios se obtuvo un gran porcentaje de las materias primas en estudio.

El municipio de Ipiales es el más relevante para esta investigación, está ubicado al sur oriente del departamento de Nariño, en los límites con la república de Ecuador, a una altura de 2.900 msnm y con una temperatura promedio de $12\pm 5^{\circ}\text{C}$. El espacio geográfico del municipio de Ipiales, tiene una extensión de 1.646 Km² que representan el 5% del área total del departamento de Nariño, ocupa el sexto lugar entre los 63 municipios. Presenta diversos pisos térmicos así: Cálido con 474 Km², medio con 317 Km², frío con 540 Km² y páramo con 315 Km² (Gobernación de Nariño, 2016).

3.1.1.2 generalidades de la arveja (*Pisum sativum* L.).

Es una hortaliza cuyo origen son las Regiones Mediterráneas orientales, Europa y Asia. Su clasificación científica es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la arveja. Fuente tomado de: (UPNA, 2009).

Clasificación	Descripción
Familia	Fabaceae
Nombre científico	<i>Pisum sativum L.</i>
Nombre común	Arveja – guisante
Descripción	Planta anual, de 0,5 a 2 m, trepadora, glauca. Flores con el estandarte y la quilla concoloras (blancas, rosadas, lilas...) y alas de púrpura a blanquecinas. Flores solitarias o en inflorescencias pedunculadas de hasta 3 flores. Fruto en legumbre alargada.

La arveja tiene una elevada cantidad de carbohidratos y proteínas por unidad de peso, lo cual hace que destaque como fuente importante de sacarosa y aminoácidos, incluyendo lisina. Además es un alimento de contenido significativo de minerales como fósforo y hierro y vitaminas.

Tabla 2. Información nutricional de la arveja por 100 g de producto comestible. Fuente: tomado de (Vaca & Landázuri, 2011)

COMPONENTES	GRANO VERDE*	GRANO SECO**
Agua	78 %	10.64 %
Proteínas	6.3 g.	24.6 %
Lípidos	0.4 g.	1 %
Hidratos de carbono	14.4 g.	62.0 %
Fibra	2 g.	ND
Cenizas	0.9 g.	ND
Vitamina A	640 (UI)	ND
Vitamina B1 o Tiamina	0.35 mg.	ND
Vitamina B2 o Riboflavina	0.14 mg.	ND
Niacina	2.9 mg.	ND
Vitamina C o Ác. Ascórbico	27 mg.	ND
Calcio	26 mg.	0.084 %
Potasio	316 mg.	0.903 %
Sodio	20 mg.	0.104 %
Fósforo	116 mg.	0.400 %
Hierro	1.9 mg.	0.006 %
Valor Energético	84 calorías	3.57 cal/g.

3.1.2 Descripción de las variedades.

3.1.2.1 Pisum sativum L. variedad (Obonuco San Isidro)

Entre las principales características que sobresalen:

- La alta adaptación en los municipios en altitudes de 2400 a 2800 m.s.n.m.
- El sistema de siembra es enmallado o tutorado para el primer semestre agrícola
- Alto rendimiento de grano verde para comercialización y grano seco para producción de semilla
- Resistencia a la *Antracnosis* y *Ascochyta*.
- El grano en estado verde tarda mayor tiempo en mostrar enfermedades.
- La planta crece de 0,76 a 2,25 metros, con flores blancas, vainas de 5,3 a 8,5 centímetros de largo y 4 a 7 semillas, granos de forma redonda lisa de color verde con hiliium de color blanco. Presenta rendimientos de 6.608 kilogramos de vainas verdes y 1.849 kilogramos de grano seco por hectárea.

El origen genético de esta variedad fue generado en 1993, cuando se cruzaron dos progenitoras (líneas 1724 y 48), del bloque de cruzamiento del programa de mejoramiento del ICA de esta especie de Nariño y en el 2000 finalizó la etapa de prueba al realizar pruebas de rendimiento y eficiencia económica.

3.1.2.2 Pisum sativum L. variedad (Alcalá)

Es una variedad mejorada de arveja originada a partir de varios cruzamientos en las que intervinieron los progenitores Santa Isabel, Australia 26, almeria 23, New Season y san Isidro, entre las características que identifican la variedad se encuentran

- La adaptación a la subregión andina del departamento de Nariño entre los 2500 y 2900 m.s.n.m. y a los altiplanos de Cundinamarca y Boyacá entre 2100 y 2800 m.s.n.m.
- Su estructura facilita las labores de tutorado, puede alcanzar rendimientos hasta de 12 toneladas por hectárea de vaina verde.
- Presenta excelente tamaño de grano y alta uniformidad de maduración.
- Es una planta que alcanza una altura de 1,41 metros, tiene hábito de crecimiento indeterminado o voluble, la flor es blanca, las vainas son de 7 a 9,2 centímetros de largas y produce de 6 a 8

granos por vaina, con rendimiento experimental de 12. 910 kilogramos por hectárea de vaina verde.

- Semillas o granos de color crema, con hilum de color negro y forma redonda.
- Es una variedad modernamente resistente a la antracnosis (*Colletotrichum pisi*) y a la mancha por ascoquita (*Ascochyta pisi*) (Valencia et al., 2010).

3.1.3 Plaguicidas.

El empleo de diferentes sustancias para combatir las plagas se remonta a más de cuatro mil años atrás (Álvarez, 2011), sin embargo el concepto de plaguicida data del siglo XIX. El empleo de estas sustancias surgió principalmente como una necesidad de mitigar los daños causados por plagas que no permitían una buena producción de alimentos. El sector que más cantidad de plaguicidas consume es el agrícola.

Según la FAO, plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquiera plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas, las de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración y alimentación. (FAO, 2012).

3.1.3.1 clases de plaguicidas.

La forma más conocida de clasificación de plaguicidas es de acuerdo a su modo de acción en el organismo que se quiere controlar.

Tabla 3. Clasificación según su acción específica. Fuente: adaptación de (Pozo., 2013)

Nombre	Control
Insecticida	Insectos
Acaricida	Ácaros
Fungicida	Hongos
Bactericida	Bacterias
Herbicida	Hierbas
Nematicida	Nematodos
Molusquicida	Moluscos
Alguicida	Algas
Esterilizante	No Reproducción
Rodenticida	Roedores
Atrayente	Confunden a los insectos por el olor de las hembras
Defoliante	Desecan las hojas
Repelente	Evitan el acercamiento de insectos, sin matarlo

En la actualidad existen cerca de 1.500 principios activos de plaguicidas y unas 100.000 formulaciones o preparados comerciales de los mismos (Orozco, F. & Torres, 2011) por esta razón, debido a su gran número y heterogeneidad, los plaguicidas se han clasificado por su modo de acción, dosis letal (DL₅₀), su evolución histórica, su estructura básica, su toxicidad, su vida media, su persistencia, entre otros.

3.1.3.2 los plaguicidas y alimentos

La utilización incorrecta de los plaguicidas, causada por la sobredosificación o aplicación inadecuada de los agricultores son las principales causas de bioacumulación de estos residuos tóxicos en las hortalizas, lo que origina riesgos para la salud humana y afecta también la comercialización en diferentes mercados internacionales. En Colombia la exposición a plaguicidas se ha convertido en un problema de Salud Pública. En el año 2007 se notificó al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública un total de 6266 casos de intoxicación por plaguicidas, 2009

(7.405), 2010 (8.016) y hasta la semana epidemiológica 40 del 2011 se reportaron 7.101, (SIVIGILA, 2013). El aumento progresivo en la cantidad de casos es atribuido al incremento en el consumo de plaguicidas en la actividad agroindustrial, (Gomes da Cruz, Cenci, & Antun Maia, 2006) indica que de los brotes de intoxicación alimentaria, las hortalizas fueron responsables del 23% más que cualquier otro alimento.

La vía principal de intoxicación con residuos de pesticidas es ingestión de sustancias que contengan este tipo de compuestos, sobre todo alimentos contaminados de origen vegetal (frutas, verduras, cereales, leguminosas, etc.) o animal (carne bovina, porcina y sus derivados, pescado, productos lácteos, huevo, etc.) y aguas. (Campoy et al., 2001).

En cualquier caso, los plaguicidas pueden entrar en el cuerpo humano por vía dérmica, oral o respiratoria, originando dos grados distintos de toxicidad: crónica (derivada de una exposición prolongada a plaguicidas en dosis muy bajas y provocada generalmente por la ingestión de alimentos que los contienen) y aguda (causada accidentalmente en su manipulación o aplicación, o bien por intentos suicidas).

En general, los plaguicidas actúan en el cuerpo humano disolviéndose en la membrana lipídica que rodea a las fibras nerviosas, interfiriendo en el transporte de iones y a su vez modificando la acción de las enzimas del metabolismo, etc. (Campoy et al., 2001). Algunos productos que tienen acción cancerígena sobre humanos, son normalmente sustancias lipófilas, que se depositan principalmente en el tejido graso y de manera decreciente en el hígado, músculo, bazo y sangre. Otro efecto observado es que se van concentrando en el tejido animal según se asciende en la cadena trófica, de forma que los consumidores primarios (herbívoros) presentan una baja concentración en sus órganos, los carnívoros más elevada, y aquellos que se sitúan en la cúpula de la pirámide llegan a tener concentraciones muy elevadas de plaguicidas. Este efecto de bioacumulación puede causar graves perjuicios en el hombre.

3.1.3.3 los plaguicidas y el medio ambiente

Los pesticidas contaminan a las personas y al medio ambiente durante toda su vida: fabricación, transporte, aplicación, contaminación de alimentos, agua, suelo, disposición final de envases, ropa, maquinaria, etc. (Pozo., 2013). Mucha de la toxicidad de los pesticidas es causada por características como: modo de acción, persistencia en el medio, vida media, absorción en

sustancias orgánicas, formación de metabolitos tóxicos, volatilidad, entre otras; que hacen que estas sustancias sigan un ciclo más amplio abarcando más territorio y afectando más ecosistemas. Así, se han detectado residuos de plaguicidas en multitud de alimentos, aguas, suelos y fluidos biológicos, entre otros (Moltó Cortés & Berrada, 2004). Los mayores riesgos se presentan con la aplicación de algunos plaguicidas, que son de eliminación más difícil, persistiendo en el suelo más tiempo. La evaluación del grado de contaminación del suelo por plaguicidas es de gran importancia por la transferencia de ellos a los alimentos. Algunos pueden permanecer durante períodos de 5 a 30 años, ocasionando un aumento en las plagas por mal uso de los plaguicidas y erosiones acabando con sus propiedades físicas y químicas (del Puerto Rodríguez, Suárez, & Palacio, 2014).

3.1.3.4 residuos de plaguicidas.

El “residuo de plaguicida” es cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, tales como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción o las impurezas que se considera que tienen una importancia toxicológica. El término “residuo de plaguicida” comprende los residuos de fuentes desconocidas o inevitables por ejemplo, de origen medioambiental, así como los usos conocidos del producto químico (Codex alimentarius, 2013).

Los Límites Máximos de Residuos (LMR) significan la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg), la Comisión del *codex alimentarius* recomienda que legalmente, los valores establecidos pueden ser utilizados en la superficie o la parte interna de productos de alimentación para consumo humano. Los LMR se basan en datos de las buenas prácticas agrícolas (BPA) y tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMR sean toxicológicamente aceptables.

3.1.3.5 plaguicidas usados en el departamento de Nariño en el cultivo de arveja.

En la tabla 4, se encuentra la información principal referente a los fungicidas utilizados para el cultivo de arveja de estudio.

Tabla 4. Fungicidas usados en arveja, grupo químico al que pertenecen, LMR (según los parámetros más bajos exigidos internacionalmente) y persistencia. Fuente: adaptado de (PPDB, 2014).

Ingrediente activo	Grupo químico	LMR mg/Kg	Persistencia (días)
Benomil	Bencimizazol	0.01	6.7
Clorotalonil	Tetracloroisoflalonitrilo	0.3	22
Carbendazim	Benzimidazol	0.01	40
Mancozeb	Ditiocarbamato	0.05	0.1
Difeconazol	Triazol	0.2	130
Propiconazol	Triazol	0.05	214

Tabla 5. Información sobre el producto comercial y la dosis de los plaguicidas utilizados en arveja. Fuente: tomado de (Pacheco, C & Vergara, 2010)

Producto comercial	Ingrediente activo	Dosis
SCORE 250 EC	DIFECONAZOL	20 CC/bomba
TILT 250 EC	PROPIONAZOL	7 CC/bomba
RIDOMIL	MANCOZEB	45 CC/bomba
DITHANE	MANCOZEB	45 CC/bomba
BENOMIL 50 WP	BENOMIL	15 CC/bomba
CARBENDAZIM 500 SC	CARBENDAZIM	15 CC/bomba
TALONIL 500 SC	CLOROTALONIL	15 CC/bomba

Tabla 6. Principales metabolitos, persistencia y efectos sobre la salud de los plaguicidas utilizados en arveja. Fuente: tomado de (Kling & Jakobsen, 1997)

Ingrediente activo	Metabolitos	Persistencia (días)	Efectos sobre la salud
1) MANCOZEB		0.1 No persistente	Comprobado: Carcinógeno, Tiene efectos reproductivos. Posible: causa de hipertrofia de ovario, Irritante para el tracto respiratorio y los ojos. Posible mutageno y disruptor endocrino.
	Etilenourea	0.5 No persistente	Comprobado: Carcinogénico, mutagenico y teratogenico.
	Etilenurea	6.2 No persistente	-
	Etileno (bis) sulfuro isocianato	0.33 No persistente	-
2) CARBENDAZIM		40 Persistente moderado	Comprobado: Efectos reproductivos. Posible: toxico hepático y carcinogénico.
	5-dihidroximetil bencimidazol carbamato	-	-
	2-aminobencimidazol	-	-
3) DIFECONAZOL		130 persistente	Comprobado: Irritante de la piel y los ojos Posible: causa de afecciones al hígado, corazón, tiroides y riñón, carcinogeno y efectos de reproducción
	1,2,4-triazol	10 No persistente	Comprobado: irritante de los ojos Posible: efectos reproductivos y sobre el desarrollo, irritante de la piel
4) BENOMIL		67 Persistente Moderado	Comprobado: mutageno, disruptor endocrino, efectos en la reproducción y el desarrollo normal, irritante del tracto respiratorio.

Posibles: posible carcinógeno, irritante de la piel, defectos en los ojos de los recién nacidos (anaftalmia), sensibilizante de la piel que puede causar dermatitis.

3.1.4 Características del hongo *ascochyta*:



Figura 2. Arveja afectada con el hongo Fuente: tomado de (Peralta, Murillo, Mazon, Monar, & Rivera, 2010)

Taxonomía

- Reino: Fungi
- Origen: Sphaeropsidales
- Familia: Sphaeropsidaceae
- Género: *Ascochyta*
- Especie: *Ascochyta Phaseolorum*

Los primeros síntomas del hongo aparecen en las hojas como manchas largas de color gris a negro. Luego el área infectada se llena de anillos concéntricos alrededor de la mancha contenida de picnidios negros; el oscurecimiento de los nódulos es característico de la infección en los tallos; esto puede rodear el tallo y matar la planta. Bajo infecciones severas, caídas de hojas prematuras pueden ocurrir. La infección de la flor puede llevar a la pudrición de las vainas y causar chancros extensivos. Las infecciones de las vainas pueden resultar en infección de semillas, que pueden ser transmitidas al siguiente cultivo. (Peralta et al., 2010)

Según la FRAC los MBC fungicidas (metil benzimidazol carbamatos) entre ellos Benomil y Carbendazim tienen su modo de acción bioquímica situado en el citoesqueleto y proteínas motoras más específicamente la β - tubulina en la mitosis de los hongos.

Los motivos por los que se decide tomar como objeto de estudio al Benomil y Carbendazim se enfatizan en las características de los tipos de arveja que se evaluarán, pues estos dos fungicidas son usados a modo de control específico para los hongos pertenecientes al género *Ascochyta* (*Ascochyta pisi*, *Ascochyta pinodes* y *Ascochyta pinodella*) perjudiciales para las arvejas, además de ello por su relación (los dos son Benzimidazoles y el Benomil se degrada en Carbendazim), su efecto sistémico (que implica persistencia y bioacumulación), por ser los fungicidas más comúnmente utilizados por los agricultores nariñenses y sobre todo por poseer un grado III de toxicidad y ser cancerígenos. (ICA, 2016)

3.1.5 Fungicidas de estudio.

3.1.5.1 Benomil (BEH).

Es un fungicida de la familia de los benzimidazoles. Su nombre químico (IUPAC) es metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol carbamato, también es conocido como Benomilo o Benomyly. Su fórmula molecular es $C_{14}H_{20}N_4O_3$ y su estructura es la siguiente:

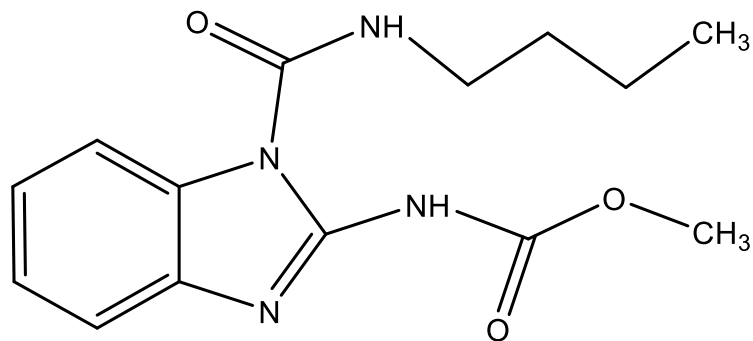


Figura 3. Estructura química del Benomil Fuente: adaptado de (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016)

El Benomil se usa como fungicida sistémico para el control de una amplia variedad de plagas antes de la cosecha y como aspersión o polvo post cosecha. Ataca un vasto espectro de enfermedades ocasionadas por hongos en hortalizas y verduras, frutas, algunas leguminosas, cereales, plantas ornamentales y jardines (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2016)

3.1.5.2 Carbendazim (MBC):

Se utiliza como fungicida benzimidazólicos de amplio espectro. Su nombre IUPAC es Metil benzimidazol-2-ylcarbamate y su fórmula molecular es $C_9H_9N_3O_2$ también es conocido como Mecarzol. Es de acción rápida, se absorbe por las raíces y los tejidos verdes de las plantas. A su vez, el Carbendazim es el metabolito primario de metiltiofanato, fungicida e insecticida que también está registrado como principio activo y también proviene de la hidrólisis del Benomil. (Fedearroz, 2015)

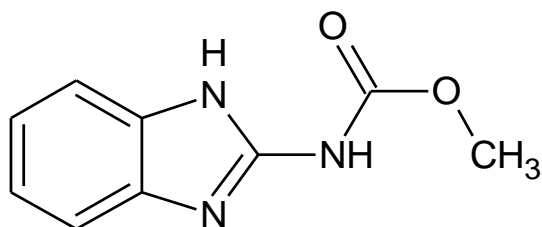


Figura 4. Estructura química del Carbendazim Fuente: adaptado de (Fedearroz, 2015)

Tabla 7. Propiedades físico-químicas del Benomil y el Carbendazim Fuente: Tomado de (Molina, 2012)

Propiedad	Plaguicida	
	Benomil ₁	Carbendazim ₂
Estado físico	Sólido en polvo cristalino	Sólido cristalino
Color	Blanco	Blanco
Densidad	No establecida	1,21 g/cm ³ a 20°C
Presión de vapor a 20°C	< 5 x 10 ⁻⁸ Pa	< 1 x 10 ⁻⁷ Pa
Coefficiente de partición octanol/agua	1,4	1,49
Solubilidad a 25°C:		
Agua	Ninguna	Dispersable
Metanol	Soluble	Soluble
Acetona	Soluble	Soluble
Tolueno	Soluble	Soluble
Coefficiente de reparto	entre 1000 y 3600	entre 1000 y 3600

3.1.6 Productos de degradación del Benomil y Carbendazim.

Se han realizado numerosos estudios para determinar el comportamiento de Benomil en el suelo y se ha demostrado la inestabilidad de Benomil bajo diversas condiciones en soluciones, plantas y suelo, degradándose a Carbendazim. La conversión de Benomil en condiciones alcalinas dirige a sus metabolitos STB (3-butil-1,3,5-triazino [1,2a] -benzimidazol-2,4 (1H, 3H) diona) y BBU 2-(3-butiraldehído) benzimidazol. (Hershberger, LW., 1993)

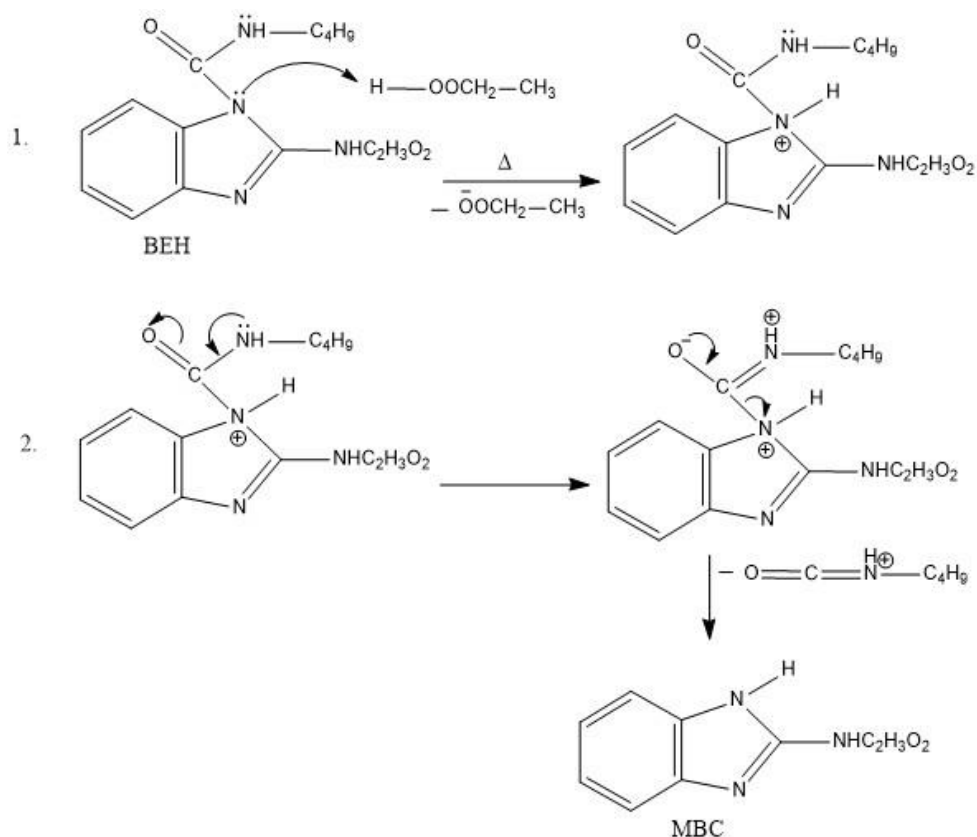


Figura 5. Mecanismos de transformación de BEH a MBC Fuente: adaptado de (Hershberger, 1993)

En un estudio realizado por (Hershberger, 1993), la hidrólisis de Benomil fue estudiada en soluciones acuosas esterilizadas y conservadas a 25 °C en oscuridad durante 30 días a pH 5, 7 y 9. En pH 5, el producto principal fue Carbendazim, mientras que a pH 7 y 9 Carbendazim y STB fueron los productos principales. STB representó aproximadamente el 25% del total.

No hubo más degradación de Carbendazim a pH 5 y 7 durante 30 días. A pH 9, sin embargo, Carbendazim se hidrolizó lentamente a 2-AB 2-aminobenzimidazol con una vida media de 54 días. A continuación se muestra la ruta de degradación de BEH y MBC bajo distintas condiciones.

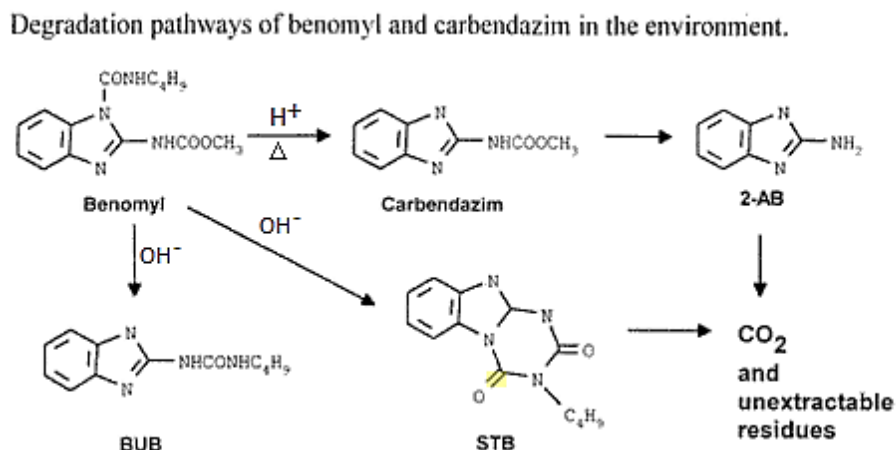


Figura 6. Rutas de degradación de Benomil bajo distintas condiciones Fuente: adaptado de (Hershberger, 1993).

3.1.7 Métodos de tratamiento de la muestra

Los análisis de pesticidas en alimentos, a niveles de trazas, requieren frecuentemente la remoción de los interferentes de alto peso molecular tales como lípidos y resinas naturales antes del análisis de cromatografía gaseosa o cromatografía líquida (Ahmed, 2001). El proceso de extracción es el primer paso y la mayor barrera en los análisis de residuos de pesticidas, involucrando a veces laboriosos procesos que consumen tiempo y grandes cantidades de solventes tóxicos. En los últimos años, el análisis de residuos de pesticidas en alimentos ha incorporado nuevas tecnologías para el desarrollo y los procedimientos de rutina, que minimizan daños ambientales, tiempo de trabajo y exposición de técnicos a químicos tóxicos. A continuación se enuncian algunas de las más utilizadas en extracción de residuos de pesticidas.

- Extracción con Fluidos súper críticos: Es una operación unitaria que aprovecha el poder disolvente de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos.
- Microextracción en fase solida: Se basa en la adsorción de los compuestos orgánicos del alimento por una fase sólida inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida. Una vez

alcanzado el equilibrio, los compuestos adsorbidos se desorben térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases. (Ministerio de Educación, 2004)

- Extracción asistida por microondas: Se extrae la muestra aplicando energía de microondas en un disolvente adecuado. (Señorans, Ibáñez, & Cifuentes, 2003)

3.1.8 Determinación de Benzimidazoles (Carbendazim y Benomil) y sus productos.

3.1.8.1 análisis de residualidad de pesticidas en alimentos.

“La complejidad del análisis de pesticidas en alimentos se debe a las bajas concentraciones en que estas sustancias están presentes, ppb o ppm, a la variedad de matriz y pesticidas existentes.” (Ramírez Milla, 2009) Actualmente los pesticidas se analizan por métodos multiresiduo que detectan un gran número de compuestos en un solo proceso.

Como punto más crítico de este procedimiento se extrae los analitos desde su matriz con un disolvente apropiado. Existen varias opciones para la extracción de residuos de pesticidas en alimentos. En su mayoría, el proceso de extracción implica la homogenización de la muestra con un disolvente orgánico, solo o en mezcla, usando un homogeneizador, conocida como extracción líquido-líquido o extracción sólido-líquido, dependiendo de la naturaleza de la muestra.

Posterior a esto, el análisis se continúa comúnmente con la separación de los analitos empleando cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a uno o varios detectores selectivos para la determinación, identificación y cuantificación de residuos de pesticidas.

Actualmente la técnica QuEChERS es la más empleada en el análisis multiresiduo de pesticidas en vegetales, debido a que es relativamente sencilla, rápida y obtiene buenos porcentajes de recuperación.

3.1.8.2 método QuEChERS.

“La técnica QUECHERS es la abreviación en inglés de las palabras: rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe).” (Agüera & de Kok, 2005) El Método Quechers para la extracción de pesticidas en alimentos, se basa en el trabajo de investigación desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, las ventajas de analizar un pesticida por este método son: altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, poco uso de solvente y material de vidrio, poco espacio de laboratorio, pocos reactivos (Agüera & de Kok, 2005).

Según Agilent Technologies, las sustancias usadas para la extracción y limpieza de pesticida son:

- *Acetonitrilo*: Precipita proteínas, que fácilmente se separan de la matriz por *centrifugación*.
- *Amina primaria secundaria (PSA)*: Es un adsorbente de intercambio aniónico débil, que elimina ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares y otros componentes que forman puentes de hidrógeno.
- *MgSO₄*: Elimina exceso de agua. El analito migra de la fase acuosa a la fase orgánica, incluso en pesticidas polares y solubles en agua.
- *Citrato*: Regula el pH, sirve para estabilizar pesticidas de carácter básico y patrones internos.
- *C₁₈*: Elimina lípidos y esteroides.
- *Carbón grafitizado (GCB)*: Eliminación de pigmentos y esteroides

(Agüera & de Kok, 2005).

3.1.8.3 métodos de análisis: cromatografía líquida.

Este tipo de cromatografía consiste en un líquido (fase móvil) que circula en íntimo contacto con un sólido o un líquido inmiscible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases, formando equilibrios de fase entre los dos sistemas, los cuales permiten que unos analitos avancen más rápidamente que otros obteniéndose de esta manera al final de la columna la separación de los compuestos de interés. (Skoog, West, Holler, & Couch, 2005).

3.1.8.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC:

En cuanto al flujo, existen dos modalidades de trabajo en cromatografía HPLC:

- *Isocrática*, el compuesto pasa por la columna cromatografía a través de la fase estacionaria mediante el bombeo fase móvil a alta presión a través de la columna manteniendo la composición

de esta constante. La muestra a analizar y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna.

- Gradiente, se llama así a la variación de la composición de la fase móvil, de esta manera se varía el poder de elución. (Generalmente crece cuando se aumenta el contenido porcentual de los componentes de naturaleza orgánica) durante la separación.

La cromatografía líquida puede clasificarse según la polaridad de cada fase (móvil y estacionaria):

- Cromatografía de fase normal: la fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, etc)

- Cromatografía de fase reversa: la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es un solvente polar (como el agua, metanol o acetonitrilo). Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía se prepara uniendo a la superficie de la partícula base de silicagel (se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos de características polares; los silanoles) a determinados grupos funcionales como el octilosilano (C8), octadecilsilano (C₁₈), fenilo, etc. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza no polar (el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir o salir de la columna), mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente (el componente más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes). En la cromatografía de fase reversa el mecanismo de separación es una mezcla de un proceso de adsorción partición (interacciones hidrofóbicas). La principal ventaja de las separaciones en fase reversa es que el agua tipo HPLC se puede utilizar como fase móvil, y además es barata y no es tóxica (este tipo de modalidad es la que se utiliza en el análisis de benzimidazoles).

(Quattrocchi & Abelaira, 1992)

En HPLC además de regular el flujo de trabajo, según la sustancia a separar, también es necesario tener en cuenta:

- Presión: la utilización de alta presión incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión, mejorando la resolución de la cromatografía.
- Temperatura: Calentando las columnas cromatográficas, usualmente, se disminuye la viscosidad del disolvente, reduciéndose así la presión requerida o permitiendo un mayor caudal. En ocasiones, al aumentar la temperatura se acortan los tiempos de retención y mejora la resolución, porque aumenta la velocidad de difusión de los solutos. Sin embargo, se puede degradar la fase estacionaria y reducir la vida de la columna si no se controla. Usando unos pocos grados por encima de la temperatura ambiente se mejora la reproductibilidad de los tiempos de retención y la precisión del análisis cuantitativo. En muchas aplicaciones no se necesita un control estricto de la temperatura, y las columnas trabajan a temperatura ambiente. (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008).

El tiempo de retención (T_R), es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector.

Un cromatógrafo líquido de alta eficacia consta de diversos componentes como son reservorios de fase móvil, bomba de alta presión, sistema de inyección de muestra, columna, un detector y un procesador de información:

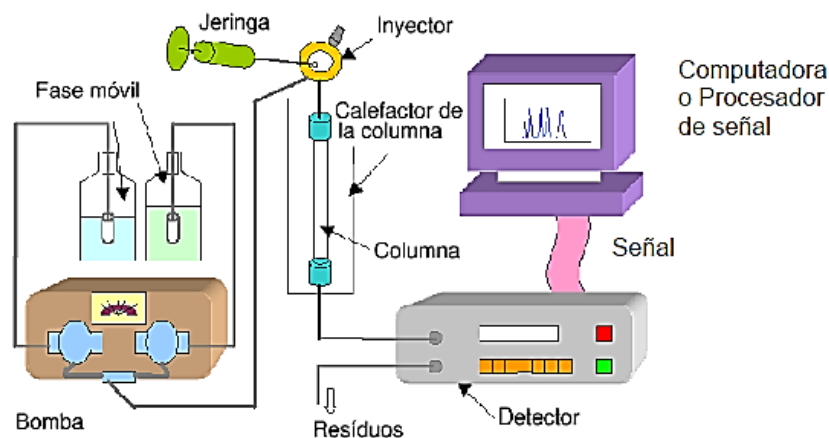


Figura 7. Componentes de un Cromatógrafo Líquido (HPLC) Fuente: tomado de (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008).

3.1.8.3.2 UHPLC acoplado a Masas

Los espectros de masas se obtienen convirtiendo los componentes de una muestra en iones gaseosos, que se mueven rápidamente en presencia de un campo magnético y se separan en función su relación masa/carga. (Berrada, H., Font, G., Monto, 2003)

Un espectro de masas representa la abundancia relativa de los distintos iones en función de su relación masa/carga (m/z). La cromatografía líquida de ultra alta presión (o rendimiento) (UHPLC) consiste en utilizar columnas empaquetadas con partículas de menos de $2\ \mu\text{m}$, junto con un sistema que soporta presiones muy altas (hasta 1500 bar). (Berrada, H., Font, G., Monto, 2003)

El objetivo de este acoplamiento cromatográfico es combinar una técnica de separación con una que ofrece detección e identificación, por medio de fuentes de ionización, como la Electrospray (ESI), convirtiéndose en una poderosa herramienta para la determinación cualitativa de compuestos en mezclas complejas, siendo ésta, una técnica de ionización suave, que puede producir iones de especies grandes y complejas en solución. (Vallejo, Tomás-Barberán, & Ferreres, 2004) Los espectros de masas suministran información sobre la estructura de especies moleculares complejas, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la composición cualitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas.

3.1.9 Tratamiento estadístico de los datos

3.1.9.1 análisis de varianza.

El análisis de la varianza (ANOVA, analysis of variance, según terminología inglesa) permite separar las diferentes fuentes de variación, la debida al error aleatorio de la medida de cualquier otra variación producida al cambiar el factor de control.

ANOVA estudia la influencia de un determinado factor o grupo de factores (variables) sobre una variable respuesta (variable continua).

Las técnicas iniciales del análisis de varianza fueron desarrolladas por Fisher en 1920 y utiliza la distribución F de Fisher como parte del contraste de Hipótesis para llevar a cabo las pruebas de significación estadística. (Lozada Castro, 2012)

La técnica ANOVA se utiliza para separar y estimar las diferentes causas de variación; de esta manera se comprueba si una alteración del factor de control (método, distintas condiciones, analista y laboratorio) ocasiona diferencias significativas entre los valores medios obtenidos; es decir, se utiliza para “analizar medidas que dependen de varios tipos de efectos que operan simultáneamente con el doble fin de decidir cuáles de ellos son importantes y poderlos estimar”. ANOVA compara medias de diversos conjuntos de resultados, no sus varianzas; el nombre de esta técnica proviene del hecho de que utiliza la comparación de parámetros estadísticos, en forma de varianzas, para llegar a la conclusión de las medias en estudio. (Lozada Castro, 2012)

Para utilizar ANOVA de forma satisfactoria deben cumplirse tres tipos de hipótesis, aunque se aceptan ligeras desviaciones de las condiciones ideales:

1. Cada conjunto de datos debe ser independiente.
2. Los resultados obtenidos para cada conjunto deben seguir una distribución normal.
3. Las varianzas de cada conjunto de datos no deben diferir de forma significativa.

El problema que se plantea es analizar si los distintos niveles del factor muestra influyen de igual forma en la respuesta. Para ello, se comparan los efectos que los distintos niveles del factor producen en la respuesta utilizando el estadístico F; se siguen los siguientes pasos.

Se establecen las hipótesis estadísticas

Hipótesis nula, $H_0: \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_h$

Hipótesis alternativa, H_1 : no todos los μ_i son iguales

Se obtiene el estadístico F (cociente de varianzas), que seguirá una distribución de probabilidad F de Fisher-Snedecor con $h - 1$ y $h(n - 1)$ grados de libertad según la Ecuación 1

$$F_{cal} = \frac{s^2_{entre\ muestras}}{s^2_{residual}} = \frac{SS_{entre\ muestras}/(h-1)}{SS_{residual}/h(n-1)} \quad Ecuación\ 1$$

Donde S^2 representa la varianza y SS la suma de cuadrados

El valor de F_{cal} se compara con el valor de $F_{Tabulado}$ para el nivel de significación fijado (generalmente 0.05); $F_{Tabulado}$ se busca en las tablas de distribución F de una o dos colas dependiendo del criterio del contraste de hipótesis elegido.

Por último, se aceptará H_0 cuando $F_{cal} \leq F_{Tabulado}[\alpha, (h-1, n-h)]$ o $\alpha_{experimental} \geq 0.05$, en este caso, las diferencias entre los distintos niveles del factor no son estadísticamente significativas, siendo errores aleatorios los producidos en los resultados al cambiar el nivel del factor de control.

ANOVA también se utiliza para validar el ajuste de los modelos matemáticos establecidos, bien mediante el estadístico F, o bien mediante el coeficiente de determinación R^2 , los cuales proporcionan el porcentaje de ajuste entre las dos variables, dependiente e independiente, del modelo.

Si $F_{cal} > F_{Tabulado}(\alpha, p, n-p-1)$, se rechaza la hipótesis nula, lo que implica la validez del modelo obtenido; el ajuste será mejor cuanto más alto sea el valor de F_{cal} . (Lozada Castro, 2012)

3.1.10 Validación de metodologías analíticas por HPLC

La validación de un procedimiento analítico es un proceso con base a estudios de laboratorio que asegura que las características de funcionamiento y confiabilidad de un método cumplen los

requerimientos para la aplicación analítica propuesta, dando un alto grado de confianza al procedimiento analítico seleccionado, dentro de un rango determinado, con resultados exactos y reproducibles. Los métodos analíticos pueden variar desde determinaciones analíticas altamente exactas y complejas a evaluaciones subjetivas, considerando esta variedad de situaciones es lógico que diferentes métodos analíticos requieran la determinación de diferentes características de funcionamiento o confiabilidad. (A.E.F.I., 2001)

Las características o parámetros de confiabilidad de los métodos analíticos que deben ser determinados y validados, cuando aplique, son:

3.1.10.1 selectividad.

Capacidad de un método analítico para medir o identificar simultaneas o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra. La presencia de interferencias puede tener distintos efectos en la determinación del analito:

- Imposibilitar su inequívoca identificación
- Distorsionar la respuesta del analito

La selectividad de un método analítico se debe determinar antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito (A.E.F.I., 2001)

3.1.10.2 idoneidad del sistema (parámetros cromatográficos).

El test de idoneidad del sistema consiste en un conjunto de ensayos que permiten comprobar en el momento de utilización del método, que el sistema es adecuado para llevar a cabo la determinación para la que se ha establecido y validado dicho método. Por lo tanto, el test de idoneidad del sistema se ha de entender como parte integrante del procedimiento de análisis y requisito previo a su realización. (Estrada. C, 2018) los parámetros de evaluación de los ensayos de idoneidad con respecto a parámetros cromatográficos más comunes son:

- **Factor de capacidad (K')**

También definido como relación de distribución de masa, se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_0). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \text{ Ecuación 2}$$

Donde:

t_0 = tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por el interior del sistema

t_R = tiempo de retención del compuesto considerado

Valores bajos de k' indican que el pico eluye muy próximo al frente de solvente, pudiendo verse comprometida la selectividad. Son recomendables valores de k' superiores a 1 consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores de 2.

- **Número de platos teóricos (N)**

El número de platos teóricos es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elución estrechas.

El cálculo del número de platos teóricos se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \text{ Ecuación 3}$$

Donde:

t_R = tiempo de retención del analito

W = ancho del pico en su base

El número de platos teóricos depende del tiempo de elución pero en general se recomienda que sea superior a 2000.

- **Resolución**

La resolución es la medida de la separación entre dos picos, Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. La fórmula de cálculo para la resolución es:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \text{ Ecuación 4}$$

Para picos de tamaño similar se alcanza una resolución a línea de base con valores de 1.5 aunque es deseable fijar una resolución mayor de 2.0. (A.E.F.I., 2001)

3.1.10.3 límites de detección y cuantificación.

Dado un método analítico determinado, se entiende por límite de cuantificación LOQ de dicho método, la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud; y por límite de detección LOD la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no necesariamente cuantificar bajo dichas condiciones experimentales.

El límite de cuantificación es por tanto un término cuantitativo mientras que el límite de detección es solo cualitativo, encontrándose entre ambos términos un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos. (A.E.F.I., 2001)

3.1.10.4 linealidad.

La linealidad es la capacidad de un método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de ajustes matemáticos) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido, buscando una respuesta de tipo lineal por medio de una interpolación e interpretación.

El coeficiente de determinación (R^2) nos indica el grado de relación entre la variable X (concentración) y la variable Y (respuesta). Su valor máximo es 1. Si R^2 es cercano a la unidad significa que existe correlación lineal con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de la relación entre las variables

El valor recomendable para el (R^2) es ≥ 0.999 , aunque en el caso de impurezas se admite ≥ 0.990 . (A.E.F.I., 2001)

3.1.10.5 precisión.

La precisión expresa el grado de concordancia (grados de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas, el objetivo de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo.

La variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método, los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de precisión.

3.1.10.5.1 repetibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto.

La Repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación (desviación estándar relativa) de una serie de medidas.

3.1.10.5.2 reproducibilidad

Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferente analista, aparatos, días, etc.) (A.E.F.I., 2001)

3.1.10.6 exactitud.

Expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o como valor de referencia y el valor experimental encontrado, en muchos casos se desconoce el valor verdadero no obstante se dispone de estándares de referencia certificados, el valor de dicho patrón es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse aplicando el método sobre dicho patrón.

Tabla 8. Ítems para la validación y sus criterios de aceptación

Fuente: recolectada de (A.E.F.I., 2001; Ambrus, A. & Fajgeli, 2000; AOAC, 2016; Quattrocchi & Abelaira, 1992)

ITEMS PARA LA VALIDACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
IDONEIDAD DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	<p>Platos teóricos (N) >2.000</p> <p>Coefficiente de variación (%CV) <2.0 % para n =6</p> <p>Factor de capacidad >2</p> <p>Intervalo Tiempo de retención <10% tomando como base el tiempo de retención promedio de las inyecciones.</p>
SELECTIVIDAD	<p>Al inyectar las soluciones no deben aparecer picos en el tiempo de retención correspondiente a MBC y BEH en condiciones normales ni por efecto matriz, excipientes o fotolisis.</p>
LINEALIDAD	<p>Los límites de confianza para la pendiente no deben incluir el cero.</p> <p>$R^2 > 0.99$</p>
PRECISIÒN	<p>%CV <2.0% para n = 6</p>
REPETIBILIDAD	<p>% CV repetibilidad < 2.0%</p>
REPRODUCIBILIDAD	<p>F calculada Analista ≤ 5.12</p>
	<p>F calculada Analista/Día ≤ 5.12</p>
	<p>% CV GLOBAL < 8.0%</p>
EXACTITUD (% recuperación)	<p>% CV $\leq 2.0\%$</p> <p>G calculada < 0.87</p> <p>El porcentaje de recuperación debe estar entre 94.50% -101.8</p>

3.1.11 Conservación de productos alimenticios.

El tratamiento térmico según (Balsa-Canto, Rodriguez-Fernandez, & Banga, 2007) es una de las más importantes operaciones industriales para la conservación de alimentos; varios autores citados por (Alvarado et al., 2009) mencionan que son dos los tipos de procesos térmicos más utilizados por la industria alimentaria: el proceso aséptico y el enlatado. Este último, objeto de estudio en esta investigación involucra la operación de esterilización. Según (Awuah, Ramaswamy, & Economides, 2007) el concepto de esterilización en el recipiente (enlatado) implica la aplicación de un tratamiento térmico a alta temperatura durante un tiempo suficientemente largo para destruir microorganismos; el cierre hermético mantiene un entorno en el contenedor que impide el crecimiento de otros microorganismos de mayor resistencia y lo más importante, evita la contaminación y crecimiento de patógenos que pueden producir toxinas durante el almacenamiento.

3.2 ANTECEDENTES

Los pesticidas son sustancias químicas destinadas a combatir plagas en el más amplio sentido. El uso de pesticidas se generalizó tras la segunda guerra mundial y su utilización está vinculada al cambio en los modelos de producción y cultivo que supusieron un importante aumento en la productividad agrícola.

Hoy los pesticidas tienen acciones muy variadas: insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, y reguladores del crecimiento entre otros. (López, García, & Fernández, 2010) por ello hasta la actualidad se han realizado diversos estudios y publicaciones acerca de los residuos, bioacumulación en los alimentos y el efecto nocivo de estos en los seres humanos.

Uno de los estudios recientes en Colombia acerca de los plaguicidas fue el realizado por (Bojacá, Arias, Ahumada, Casilimas, & Schrevens, 2013) donde se analizó la presencia de 17 residuos de plaguicidas en tomates recién cosechados. Los residuos de plaguicidas se cuantificaron mediante un método multiresiduo utilizando un cromatógrafo de líquidos de ultra rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas; Los resultados mostraron que todas las muestras positivas para el plaguicida acefato excedieron los LMR recomendados, indicando el uso indiscriminado de este insecticida.

Anteriormente en el año 2007 (Danaher, De Ruyck, Crooks, Dowling, & O’Keeffe, 2007) realizaron un trabajo donde se estudiaron algunos benzimidazoles entre ellos (Carbendazim, Benomil Parbendazol, etc.) y se discutieron sus efectos farmacológicos y propiedades fisicoquímicas, se estudió también la importancia de seleccionar procedimientos adecuados de extracción, junto con las dificultades encontradas en la adaptación de los métodos de residuos individuales a los métodos de residuos múltiples. Finalmente para determinar los benzimidazoles se utilizaron las técnicas de HPLC-MS y GC-MS.

Teniendo en cuenta que la mayoría de pesticidas y en especial los carbamatos y benzimidazoles no son volátiles los estudios empezaron a utilizar como técnica principal HPLC para identificarlos. En cuanto al método de extracción (Michel & Buszewski, 2004) realizaron un trabajo cuyo objetivo fue demostrar que la matriz de dispersión en fase sólida (MSPD) acoplada con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) podría ser utilizada para la determinación y cuantificación de residuos de Carbendazim en muestras de plantas. Se evaluó y validó su desempeño y las recuperaciones fueron de 84,3 a 90,7%, el método se probó exitosamente en muestras de cereal y se encontró que los resultados obtenidos con el presente procedimiento MSPD-HPLC se comparaban bien y tenían ventaja con los obtenidos con el procedimiento que implicaba LLE.

Más recientemente, (Ahumada & Zamudio, 2011) desarrollaron un método multiresiduo para la determinación de 24 plaguicidas de diferentes características fisicoquímicas en tomate. El proceso de extracción se basó en el método QuEChERS y la determinación de los compuestos se realizó mediante cromatografía líquida ultrarrápida acoplada a espectrometría de masas. Los resultados de la validación indicaron que el método presenta porcentajes de recuperación entre el 71,3 y el 114% mostrando significantes mejorías a la extracción en fase sólida y posteriormente (Nantia, Moreno, Manfo, Gámiz, & Campaña, 2017) desarrollaron y validaron un nuevo método confiable, rápido y altamente sensible basado en la espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento para la determinación de 28 carbamatos en hierbas aromáticas.

La mayoría de los estudios e investigaciones realizadas en cuanto a determinación de residuos de pesticidas en vegetales tiene como enfoque la aprobación para la comercialización internacional que exige el *codex alimentarius*, como resultado de la bioacumulación estos residuos se pueden encontrar incluso en derivados de los vegetales como lo demostró (Molina, 2012) donde se estima

que Benomil y Carbendazim son los fungicidas benzimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid para controlar la podredumbre de los racimos.

El problema mayor se presenta cuando son necesarias aplicaciones en épocas muy cercanas a la cosecha, permitiendo el paso de residuos de estos fungicidas desde uvas al mosto y luego al vino. El método implementado consistió en una extracción con acetato de etilo, posterior conversión del Benomil a Carbendazim y concentración e inyección en cromatógrafo líquido de alta resolución y detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA).

Los valores obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos por el SENASA en su Resolución 138/2002, el *codex alimentarius*, 1999 y Quatrocchi, 1992. Con esto se puede concluir que se obtuvo un método confiable con el cual controlar los niveles de contaminación de Benomil y Carbendazim en los vinos.

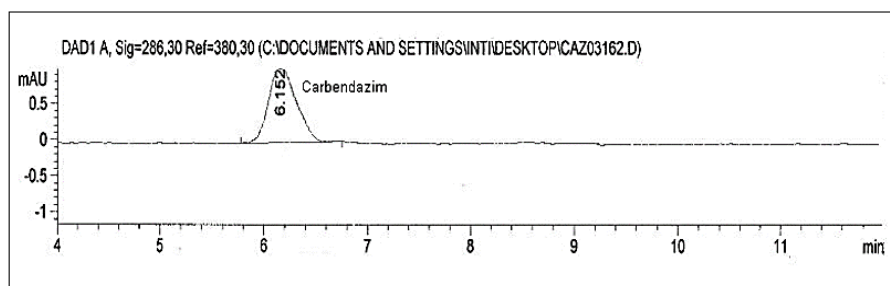


Figura 8. Cromatograma de Carbendazim Fuente: (Molina, 2012)

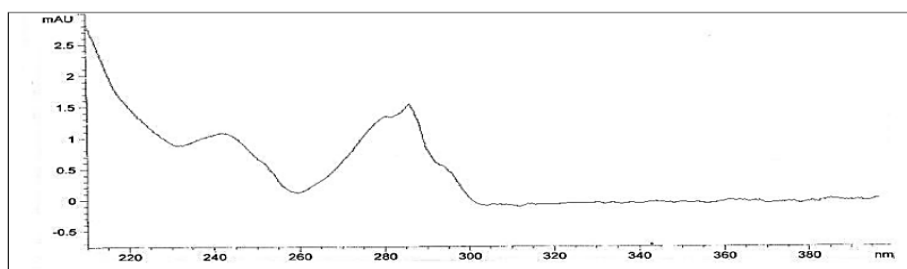


Figura 9. Espectro UV Carbendazim Fuente: (Molina, 2012)

Al igual que en los derivados de vegetales este método se ha llevado a cabo directamente sobre matrices vegetales como se implementó en (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008) En este trabajo se validó una metodología para la determinación de residuos de Benomil, Carbendazim y tiabendazol, en fresa y lechuga por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo

de diodos (HPLC-PDA), y siguiendo la metodología anteriormente descrita. Con límites de detección de 0,40 y 0,27 mg/kg y límites de cuantificación de 1,35 y 0,81 mg/kg para Carbendazim y tiabendazol respectivamente. Los porcentajes de recuperación son de 90% teniendo suficientes bases para concluir que no se encontraron residuos de estos compuestos en muestras recolectadas en algunos municipios de Cundinamarca, Colombia. Lo que abrió la puerta a su exportación.

Como se observa las investigaciones de residuos de pesticidas en vegetales son variadas, pero los estudios e información acerca de estos residuos fungicidas en las arvejas es limitada, se realizó un estudio del fungicida azoxistrobina en (Abdelraheem, Hassan, Arief, & Mohammad, 2015) donde se presentó un método de validación para la extracción y análisis cuantitativo de residuos de azoxistrobina en habas verdes y arvejas, usando HPLC-UV y los resultados confirmados por GC-MS. El método empleado implicó la extracción inicial con acetonitrilo después de la adición de sales (sulfato de magnesio y cloruro de sodio), seguido de una etapa de limpieza por carbono neutro activado. Bastante parecida a la metodología que se llevará a cabo en el presente estudio, por lo que se ha demostrado que el método es eficiente para la extracción y determinación de residuos de azoxistrobina en habas verdes y arvejas.

Uno de los estudios más recientes acerca de los residuos de fungicidas benzimidazólicos en la arveja fue realizado por (Wani et al., 2019) donde se llevó a cabo la evaluación de riesgos, el período de semivida y la validación del método de carbendazim y triazofos por HPLC basándose en las normas sante 2017. Se utilizó la técnica QuEChERS para la extracción y El método mostró ser lineal, preciso y exacto. El nivel de residuos de carbendazim y triazofos se observó hasta el tercer día y se alcanzó por debajo del límite de detección de arveja verde al quinto día después del tratamiento con la formulación de carbendazim y triazofos a las dosis recomendadas. Este estudio mostró que la residualidad persiste hasta 5 días después de la cosecha para el grano fresco sin procesar.

A pesar de que el departamento de Nariño es principalmente agrícola la información y estudios de estos fungicidas en la arveja es escasa, desde las ciencias agrícolas se han realizado estudios enfocados en el complejo Fungi (*Ascochyta*) que afecta principalmente la vaina de la arveja, en el estudio de (Valencia et al., 2010) Titulado “Evaluación de 20 líneas de arveja (*pisum sativum l.*) y su reacción al complejo de *ascochyta*” mostraron que la aplicación química de la mezcla de los

fungicidas Mancozeb y Benomil afectó el desarrollo del patógeno, logrando reducir significativamente el porcentaje de severidad en algunas líneas, sin afectar el rendimiento de las mismas, siguiendo esta línea y conociendo la alta toxicidad de estos fungicidas (Mejía., 2012) en su trabajo “Evaluación de la sensibilidad del complejo *Ascochyta* en arveja (*pisum sativum*) al jugo de fique (*Furcraea gigantea*) pasteurizado” propuso una alternativa a la residualidad de fungicidas benzimidazólicos donde se evaluó el comportamiento de jugo de fique pasteurizado como posible bioinsumo para el control de la enfermedad de *Ascochyta* en arveja, los ensayos de actividad in vitro del bioinsumo pasteurizado contra *Ascochyta*, arrojaron una EC₅₀ de 180,2 mg/L y una concentración mínima inhibidora (MIC) de 25.000 mg/L, estadísticamente igual al efecto del Benomil, los resultados muestran que el fique puede considerarse como un potencial biofungicida con amplia proyección de uso; Sin embargo no se reporta un método para la evaluación de residuos de fungicidas BEH y MBC en conservas de arveja, en este trabajo se desarrolló y validó la metodología para este producto.

La limitada información e investigación de residuos benzimidazólicos como el Carbendazim y Benomil en arvejas para conserva y exportación abre la puerta para este y otros estudios.

MATERIALES Y METODOS

4.1 REACTIVOS

4.1.1 Estándares

- Benomyl pestanaltm estándar analítico de 98.5%, *sigma-aldrich, USA*.
- Carbendazim estándar analítico de 97%, *sigma-aldrich, USA*.

4.1.2 Disolventes

- Acetato de etilo 99,5%, *Sigma-Aldrich*, Acetonitrilo (ACN) grado HPLC 99.99% *Honeywell Burdick & Jackson, USA*.
- Agua grado HPLC

4.1.3 Otros reactivos

- Ácido acético glacial 99.8% *Sigma-Aldrich, USA*
- Hidroxido de sodio 97% *Carlo Erba, Francia*

4.2 EQUIPOS Y MATERIALES

4.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector PDA (HPLC-PDA).

Se usó un sistema HPLC (*Waters Breeze 1525*), equipado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA 2898), bomba binaria y válvula de inyección manual RHEODYNE, los datos fueron procesados utilizando el software EMPOWER II (Waters corporation). Se empleó una columna analítica C_{18} *Phenomenex kinetex* de 250 mm x 4.6 mm x 3.5 μm .

4.2.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS).

Ver condiciones en el apartado 4.7.

4.2.3 Otros equipos.

- Centrifuga Velocity 18R Bench-top - Dynamica Scientific Ltd.
- Escaldador JAVAR tecnología alimentaria.
- Autoclave All American EPSS modelo 75X.
- Ultrasonido Fisher scientific.
- Balanza analítica OHAUS | Adventurer®
- Planchas agitadora Fisher scientific.
- Enlatadora Julius M.J
- Purificador de agua (grado HPLC) Sartorius Stedim

4.2.4 Materiales.

- Filtros GHP de 0.45 μm x 13 mm *PALL*
- Mortero de porcelana
- Viales ámbar 1mL
- Micropipetas de 0,5-10 μL , 10-100 μL y 100-1000 μL *BOECO germany*
- Balones aforados Hirschmann Instruments™
- Material de vidrio (pipetas aforadas y graduadas, buretas, probetas, erlenmeyer, beaker, embudos, frascos transparentes y ámbar de 30 mL, viales transparentes para HPLC).
- Latas de 65 x 102 mm

- QuEChERS roQ™ *Phenomenex* Extraction Kit X100 und. Part No.: KSO-8917-NC

4.3 MUESTREO

4.3.1 Selección de unidades de muestreo.

El tipo de muestreo para obtener la materia prima y realizar el proceso de conservación utilizado fue el muestreo simple aleatorio, este se hizo de manera representativa considerando que la plantación se dividió en 4 unidades, dentro de éstas se tomaron sub-unidades cuyo follaje fuera uniforme, la selección fue basada en los criterios establecidos por la Norma NTON-17002-02 (FAO, 2012). El muestreo del cultivo de arveja fue realizado en la Exprovincia de Obando. Las muestras seleccionadas son provenientes de 3 fincas productoras de arveja del municipio de Ipiales y zonas aledañas dentro de la Exprovincia de Obando figura 10.

Las cuales fueron:

- La Soledad (Ipiales) Productora de arveja Variedad Alcalá
- La hacienda (Puerres) Productora de arveja Variedad San Isidro
- Miraflores (Pupiales) Productora de arveja Variedad San Isidro

En estas fincas los cultivos de arveja tecnificados son tratados con Benomil y Carbendazim, y se cultivan las arvejas de las variedades de interés.

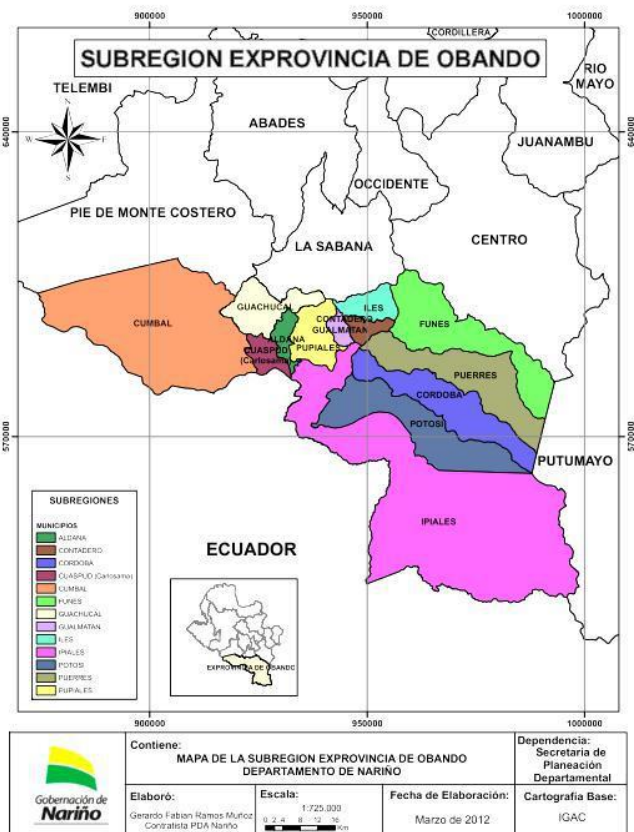


Figura 10. Ubicación de la Exprovincia de Obando Fuente: tomada de (Gobernación de Nariño, 2016)

Para determinar el número de muestras a tomarse, se tuvo en cuenta el estado de la planta. Elección de los mejores granos razonablemente tiernos, buena textura y aspecto (sin piel desprendida, enteros y sin ninguna marca).

4.3.2 Origen de las muestras.

El material vegetal para el análisis es proveniente de dos zonas, el cultivo de arveja que se ubica en el sector Agropecuario del Centro Internacional de Producción Limpia LOPE, SENA Regional Nariño (muestras libres de fungicidas) y de las fincas nombradas anteriormente (muestras para procesamiento en planta piloto)

De las unidades de muestra se pesó un tamaño de 2 kg, que se dividió en dos partes, una para análisis de laboratorio y las otras para su procesamiento en Planta Piloto.

4.3.3 Muestra analítica.

De las muestras de arveja tanto procesadas como frescas de las dos variedades estudiadas, se tomó una sub-muestra de 100 g, se homogenizaron y posterior a esto se tomó una muestra analítica de 10.0 g que representa el 0,5% de la muestra tomada inicialmente, y se procedió a la extracción.

4.4 PROCEDIMIENTOS

4.4.1 Preparación de estándares.

La construcción de las curvas de calibrado se realizó a partir de disoluciones patrón de los analitos de concentración conocida, dentro el rango de concentración que se espera encontrar de los mismos en las muestras a analizar en los ensayos.

Las soluciones se prepararon a partir de los estándares de referencia.

4.4.1.1 Soluciones madre de BEH y MBC a 100 µg/mL:

Teniendo en cuenta la pureza de los reactivos se pesó aproximadamente 10.30 mg de MBC y 10.15 mg de BEH de los estándares de referencia, se colocó en un matraz volumétrico de 100 ± 0.1 mL y se aforó con acetato de etilo hasta completar el volumen.(Ahumada & Zamudio, 2011)

A partir de las soluciones madre se realizan las soluciones estándar para la curva de calibración, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 9. Datos para la preparación de los estándares de BEH y MBC

Fuente: esta investigación.

BEH			MBC		
Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Sln madre (μL)	Vol final (mL)	Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Sln madre (μL)	Vol final (mL)
0.01	2.500	25	0.01	2.500	25
0.05	12.50	25	0.05	12.50	25
0.10	25.00	25	0.10	25.00	25
0.50	125.0	25	0.50	125.0	25
1.00	250.0	25	1.00	250.0	25
5.00	1250	25	5.00	1250	25

Nota: Todas las soluciones preparadas fueron colocadas en viales de color ámbar y se almacenaron a 4° C.

4.4.2 Preparación de muestras para la determinación de BEH y MBC con la técnica

QuEChERS

Siendo la finalidad del trabajo validar una metodología analítica para la determinación de Benomil y Carbendazim en arveja, es importante aclarar que si bien con este método se extrae BEH y MBC, el BEH al ser poco estable es convertido a MBC durante la extracción, para luego ser cuantificado. (Ver apartado 3.1.6 de marco teórico). Es decir que se cuantificó como la suma de BEH y MBC expresada como MBC total. Previo a la detección de los benzimidazoles por cromatografía, se realizó un tratamiento de la muestra con el fin de extraer de la matriz los residuos de fungicidas y eliminar todas aquellas sustancias interferentes presentes en la arveja.

4.4.2.1 preparación de muestras.

Las muestras se trituraron y homogenizaron en un mortero por separado. Para las muestras frescas se adicionó 10.0 mL de agua grado HPLC (acidificada con 5.0 μL de ácido acético) de tal forma que se pueda obtener una mezcla homogénea y para las muestras procesadas se retiró el líquido de conservación y se acidificó de igual manera. Debido a que el LMR para Benomil corresponde a la suma de los residuos de éste y de su forma hidrolizada activa (Carbendazim) fue necesario asegurar la hidrólisis de Benomil a Carbendazim acidificando las muestras antes de realizar el proceso de

extracción por ello se adicionó el ácido acético, esto en conjunto con un tratamiento térmico a una temperatura de 80°C durante una hora con agitación magnética constante siguiendo los protocolos descritos en (Molina, 2012) y (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008), a este pH (4.25) el MBC se mantiene como metabolito estable. Posterior a ello se lleva a cabo el proceso de extracción mediante el procedimiento QuEChERS. (AOAC, 2007)



Figura 11. Trituración y homogenización de muestra Fuente: esta investigación.

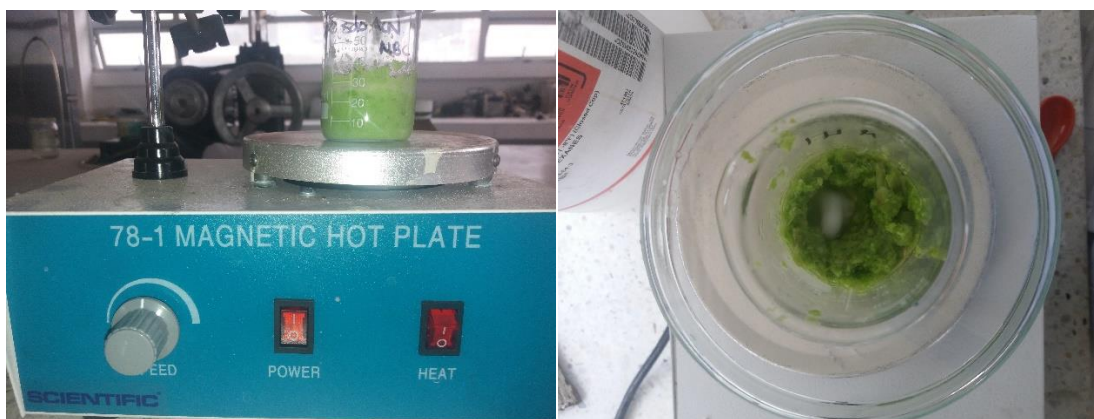


Figura 12. Tratamiento térmico para conversión de BEH en MBC Fuente: esta investigación.

4.4.2.2 extracción.

En este estudio se aplicó el procedimiento QuEChERS método aprobado por (AOAC, 2007) para la extracción de residuos de plaguicidas, utilizando el kit, que contiene: tubos de 2 mL, $MgSO_4$ (sulfato de magnesio anhidro), PSA (amina primaria secundaria), GCB (carbón grafitizado), C_{18} (octadecilsilil), NaCl (cloruro de sodio), $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Citrato de trisodio dihidratado).

El procedimiento implicó las siguientes etapas (AOAC, 2007):

Se pesó 10.0 g de la muestra ya homogenizada con tratamiento térmico, se trasvasó a tubos de centrifuga y se adicionó 10.00 mL de Acetonitrilo grado HPLC (figura 11), se agitó y se adicionó el tubo contenedor de las sales (QuEChERS) se agitó vigorosamente durante 16 minutos y finalmente se colocó la mezcla a centrifugar durante 20 minutos a 4500 rpm (figura 13).

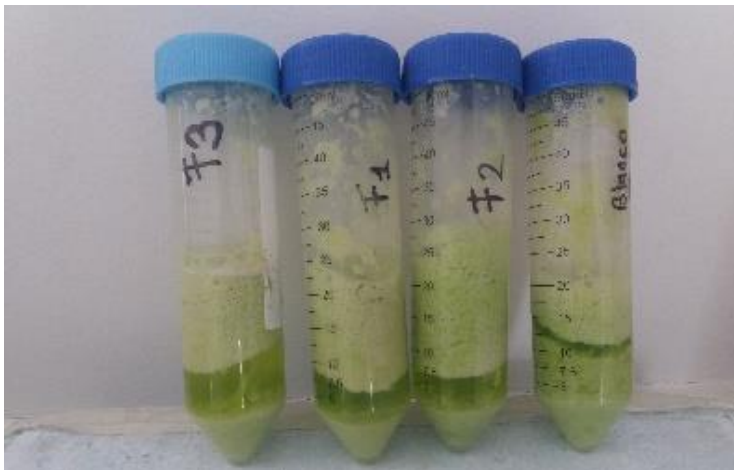


Figura 13. Muestras en tubos de centrifuga con Acetonitrilo Fuente: esta investigación.



Figura 14. Tubo QuEChERS y muestra antes de la centrifugación Fuente: esta investigación.

Después de la centrifugación de la muestra se obtuvieron dos fases separadas debido a la adición de cloruro de sodio y cloruro de magnesio. La adición de dichas sales induce la separación de las dos fases y que el analito migre de la fase sólida a la fase acuosa, obteniéndose recuperaciones

muy altas. La fase sólida se encuentra en la parte inferior mientras que la acuosa la encontramos en la parte superior, y es en esta fase donde se encontraron por tanto los analitos de interés (Figura 15). Los citratos se añadieron como agentes reguladores de pH (Ponce Robles, 2012).



Figura 15. Muestra después de la extracción QuEChERS Fuente: esta investigación.

Finalmente se tomó 1.00 mL del extracto al cual se le realizó un clean up con un filtro GHP de $0.45\mu\text{m} \times 13 \text{ mm}$, quedando así listo para su análisis cromatográfico.

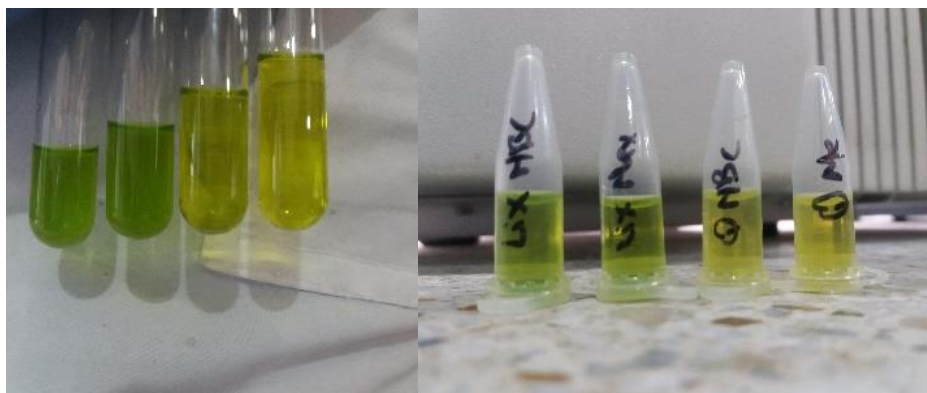


Figura 16. Extractos de arveja Fuente: esta investigación.

4.4.2.3 preparación de extracto de arveja (blanco matriz).

El extracto de arveja blanco matriz fue aquel que no contenía el analito de interés, para confirmar esto los granos fueron obtenidos de cultivos libres de fungicidas provenientes de LOPE-SENA. Se preparó mediante el método QuEChERS que se indicó en el apartado 4.4.2.2

4.4.2.4 preparación de extracto de la vaina de arveja .

El extracto se obtuvo a partir de 15.0 g de las vainas de arveja recién cosechadas, estas fueron cortadas y homogenizadas con la adición de 10.00 mL de agua (acidificada con 50 μ L de ácido acético) posteriormente se siguió el procedimiento de extracción con QuEChERS que se indicó en el apartado 4.4.2.2

4.4.2.5 características sobre los fungicidas comerciales.

A continuación se presentan en la tabla 10 las características de los productos comerciales de BEH y MBC utilizados por los agricultores de las fincas proveedoras de las muestras de arveja. (Ver anexo B)

Tabla 10. Información sobre las sustancias activas BEH y MBC Fuente: esta investigación.

Reactivo	Pureza de acuerdo al producto comercial	Abreviatura	Producto comercial
Benomil	50% p/p	BEH	BENOMIL μ WP
Carbendazim	500 g/L	MBC	CARBENDAZIM 500

4.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE HPLC-PDA.

4.5.1 Condiciones cromatográficas:

A continuación se encontrarán especificaciones para el análisis en una columna C₁₈, se tomó como referencia las condiciones cromatográficas descritas por (Araujo, JJ., Dangond & Dallos, 2008) y se ajustó a las condiciones óptimas para el equipo HPLC-PDA de la Universidad De Nariño con los siguientes parámetros:

1. Curvas de van Deemter para determinar el flujo óptimo (ver anexo K).
2. Pruebas de isocráticas y de gradiente cambiando proporciones de fase móvil.
3. Se realizó un análisis de idoneidad del sistema evaluado con los criterios mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Criterios de aceptación de idoneidad del sistema Fuente: recolectado de (A.E.F.I., 2001; Estrada. C, 2018)

PARÁMETRO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Factor de capacidad (K)	Se acepta que K sea mayor a 2.
Platos teóricos o eficiencia de la columna (N)	N deberá ser mayor a 2000 o según sea el caso de acuerdo al tipo de columna utilizada en la validación.
Resolución (R)	Se acepta que la resolución entre picos adyacentes debe ser mayor a 2,0.
Precisión/ Repetibilidad de inyección (% CV):	%CV de las áreas y tiempos de retención para n inyecciones del estándar en general se acepta que %CV no sea mayor al 2% para 5 o 6 inyecciones consecutivas.
Tiempos de retención	El Intervalo de los Tiempos de retención debe ser <10% para los picos de Carbendazim y Benomil, tomando como base el tiempo de retención promedio de las inyecciones.

El solvente para la fase móvil fue: agua y acetonitrilo, a un flujo de 1 mL/min, utilizando el gradiente de elución que se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Gradiente de fase móvil, Fuente: esta investigación.

TIEMPO (min)	FASE	
	H ₂ O (%A)	ACN (%B)
0	100	0
10	20	80
15	20	80
18	100	0
20	100	0

A partir de una solución madre de 100 mg/L se obtuvo un estándar de 5 mg/L en un balón aforado de 25.00 mL, la solución fue previamente filtrada en un filtro GHP de 0.45µm x 13 mm para eliminar cualquier residuo sólido, a una temperatura de horno de 30°C y la detección se realizó a las longitudes de onda de 280 y 285 nm. Estos datos fueron resumidos en la tabla 13 a continuación.

Tabla 13. Parámetros instrumentales para HPLC, Fuente: esta investigación.

Parámetros instrumentales	MBC	BEH
Fase móvil	H ₂ O:AcN	H ₂ O:AcN
Flujo	1.0 mL/min	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL	20 µL
Tiempo de retención	8.1±0.41 min	12.1±0.6 min
Modo de elución	Gradiente	Gradiente

Para determinación UV-VIS: Detección a longitud de onda de 285 para Carbendazim y detección a 293 nm para Benomil.

Luego de la verificación de las condiciones cromatográficas se procedió a la validación de los siguientes parámetros:

4.5.2 Selectividad:

Para evaluar la selectividad se realizaron diferentes análisis de identificación y confirmación de los analitos de interés frente a posibles interferentes en el HPLC-PDA bajo las condiciones descritas en el apartado 4.5.1

Las posibles interferencias son:

1. Componentes de la matriz cercanos a los tiempos de retención de los analitos de interés.
2. Al tratarse de productos comerciales que contienen solo el 50% del principio activo se evaluaron las señales correspondientes a los excipientes cercanos a los tiempos de retención de los analitos de interés.

4.5.2.1 hidrolisis ácida.

Muestras libres de fungicidas (*blanco matriz*) y homogenizadas con 10.00 mL de agua (acidificada con 5.0 µL de ácido acético) fueron fortificadas a concentración de 1 mg/L (aforado a 10.00 mL con Acetato de etilo) de BEH y MBC por separado; posteriormente se les realizó el procedimiento de extracción con QuEChERS, se tomó 1.00 mL de los extractos los cuales fueron acidificados con 5.0 µL adicionales de ácido acético, filtrados y analizados en un periodo de 1 hora por HPLC-PDA.

4.5.2.2 evaluación de excipientes.

Se preparó una solución de 100 mg/L a partir de los productos comerciales de MBC y BEH adicionando 20.00 mg de cada uno (esto teniendo en cuenta que el principio activo es del 50%) a un matraz de 100 mL aforando con Acetato de etilo, de esta solución se preparó un estándar de 1 mg/L que fue filtrado y analizado por HPLC-PDA.

4.5.2.3 evaluación del efecto matriz.

Muestras libres de fungicidas (*blanco matriz*) fueron fortificadas a concentración de 5 mg/L con una solución estándar de MBC total posteriormente se llevó a cabo el procedimiento de extracción con QuEChERS descrito en el apartado 4.4.2 una vez obtenido el extracto se filtró y se realizó el análisis HPLC-PDA.

4.5.3 Efecto del pH y la temperatura en matriz fortificada con estándares de los fungicidas.

4.5.3.1 efecto del pH.

45.0 g de Muestra libre de fungicidas (*blanco matriz*) se dividió en 3 partes (15.0 g c/u) las cuales fueron homogenizadas con 10.00 mL de agua (acidificada con 5.0 μ L de ácido acético) posteriormente fueron fortificadas a concentración de 1 mg/L, estándar obtenido de las soluciones madre de BEH y MBC, y aforado a 10.00 mL con acetato de etilo, que representó el Nivel medio (pH= 4.25), posteriormente se les realizó la extracción con QuEChERS, los extractos se sometieron a 2 variaciones que consistieron en la adición de 5.0 μ L de NaOH en 1 mL del extracto para el nivel alto (pH=6) y en la adición de 5.0 μ L de CH₃COOH en 1 mL del extracto para el nivel bajo (pH=3), de acuerdo a lo reportado por (Hershberger, 1993) los 3 extractos fueron filtrados y analizados por HPLC-PDA.

4.5.3.2 efecto de la temperatura.

45.0 g de Muestra libre de fungicidas y homogenizada se dividió en 3 partes (15.0 g c/u) las cuales fueron homogenizadas con 10.00 mL de agua (acidificada con 5.0 μ L de ácido acético) posteriormente fueron fortificadas a concentración de 1 mg/L, estándar obtenido de las soluciones madre de BEH y MBC, y aforado a 10.00 mL con Acetato de etilo, cada parte fue sometida a un tratamiento térmico que consistió en:

- Baño de hielo T 0°C nivel bajo
- Calentamiento T 90° nivel medio
- Calentamiento T 120° nivel alto

Posteriormente se les realizó la extracción con QuEChERS, los 3 extractos fueron filtrados y analizados por HPLC-PDA.

4.5.4 Linealidad.

4.5.4.1 linealidad del sistema.

Para el estudio de la linealidad del sistema se realizó una curva de calibración. Se prepararon soluciones de concentración conocida a partir del estándar de MBC (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 y 5.00 mg/L este rango de concentraciones fue elegido debido a que son concentraciones cercanas a

los límites legislados de 0.01 mg/L tanto del BEH y del MBC por el *codex alimentarius*). Se inyectaron 6 niveles de concentración, por duplicado, de soluciones de MBC.

4.5.4.2 linealidad del método.

La linealidad del método se determinó analizando la matriz (*blanco de arveja*) fortificada con el estándar de MBC en el siguiente rango de concentraciones: 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 y 5.00 mg/L. La linealidad del método se trabajó con tres replicas para cada punto de la curva de calibración.

Conjuntamente se determinó el rango lineal a partir de herramientas estadísticas como la ANOVA del programa statgraphics centurión plus versión XVII para validar el ajuste del modelo matemático establecido, mediante el estadístico F y el R^2 . Además de realizar otros test como el T-student y G-cochran.

Para el análisis se emplearon las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 4.5.1.

4.5.5 Límites de detección y cuantificación:

Los límites se estimaron a partir de la curva de regresión para bajas concentraciones de los analitos y 10 determinaciones individuales (n'). De dicha curva se determinó la pendiente (b) y por extrapolación a concentración cero, se obtuvo un estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}). A partir de la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se determinó la recta correspondiente y por extrapolación se estimó la desviación estándar del blanco (S_{bl}). Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las ecuaciones 5 y 6, en las cuales se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente (Silvia B Visciglio, 2010).

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

n' = número de determinaciones individuales.

b = pendiente de la curva de regresión a bajas concentraciones de los analitos.

Y_{bl} = estimado de la respuesta del blanco a concentración cero.

S_{bl} = estimado de la desviación estándar del blanco a concentración cero.

Como complemento a este método se llevó a cabo la determinación de los límites mediante las ecuaciones:

$$LOD = 3 * N/b \text{ Ecuación 7}$$

$$LOQ = 10 * N/b \text{ Ecuación 8}$$

Donde:

N = desviación estándar de 10 determinaciones individuales.

b = pendiente de la curva de regresión a bajas concentraciones de los analitos.

4.5.6 Precisión.

4.5.6.1 repetibilidad del sistema.

A partir de la solución madre de 100 mg/L se preparó una solución estándar a concentración de 5 mg/L, la repetibilidad para el sistema se evaluó realizando 5 inyecciones de esta solución y se realizó conjuntamente con los ensayos de idoneidad del sistema.

4.5.6.2 repetibilidad del método.

Muestras libres de fungicidas (*blanco matriz*) fueron fortificadas a concentración de 5 mg/L con una solución estándar de MBC total posteriormente se llevó a cabo el procedimiento de extracción con QuEChERS descrito en el apartado 4.4.2 una vez obtenidos los extractos se filtró y se realizó el análisis HPLC-PDA. La repetibilidad para el método se evaluó realizando 5 inyecciones de esta solución.

4.5.6.3 reproducibilidad del método.

Muestras libres de fungicidas (*blanco matriz*) fueron fortificadas a concentración de 5 mg/L con una solución estándar de MBC total posteriormente se llevó a cabo el procedimiento de extracción con QuEChERS descrito en el apartado 4.4.2 una vez obtenidos los extractos se filtró y se realizó el análisis HPLC-PDA, la reproducibilidad del método, se evaluó realizando 6 inyecciones, entre días y entre analistas. Se realizaron determinaciones en dos días diferentes, por dos analistas y valorando tres replicas por día.

Los valores de %RSD máximos establecidos por la (AOAC, 2016) para trazas en concentraciones \leq a 10 mg/L de analito son del 8%.

4.5.7 Exactitud.

La exactitud del método se evaluó mediante estudios de recuperación. Se llevaron a cabo 3 réplicas de cada extracto enriquecidos a 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/L que se obtuvieron a partir de la solución madre de 100 mg/L. Se aplicó el método de preparación de muestra descrito en 4.4.2.

Se tomó como referencia el criterio de aceptación establecido por el *codex alimentarius* para residuos de plaguicidas que considera recuperaciones aceptables a las comprendidas entre 70% y 120% (Molina, 2012).

4.6 PROCESAMIENTO EN LA PLANTA PILOTO

4.6.1 Recolección de las muestras.

Se utilizaron 4 Kg de semillas de arvejas (*Pisum sativum* L.) de la variedad San Isidro (semilla verde, hilum blanco, lisa) y 4 Kg Alcalá (semilla verde, hilum negro, lisa), el material se recolectó al sexto mes de establecido el cultivo en las Fincas: La Soledad (Ipiiales), La Hacienda (Puerres), Miraflores (Pupiales) y la granjas del Centro Internacional de Producción Limpia LOPE, Sena Regional Nariño. Los materiales fueron inspeccionados de acuerdo a la norma técnica colombiana (Medina & Trujillo, 2002)

4.6.2 Proceso de conservación de la arveja.

Una vez recolectadas las muestras, se procedió a realizar un lavado con agua a las arvejas de las 2 variedades, posteriormente se sometió a un tratamiento térmico, se utilizó la metodología descrita por (Garrote, Silva, & Roa, 2009) con algunas modificaciones. El material fue seleccionado y escaldado a 100°C por 5 minutos. Se utilizó latas de 65 x 102 mm las cuales fueron llenadas con 165 g de arveja y completadas con líquido de cobertura (temperatura del líquido 92- 95 °C) hasta obtener espacios de cabeza de 8 mm aproximadamente. Enseguida se llevó a cabo el exhausting por 1 minuto a 92-95 °C y se realizó el sellado hermético de las latas con una cerradora Julius M.J. Las latas se colocaron en un autoclave All American Epss modelo 75X. Las condiciones de operación del autoclave se manejaron conforme al protocolo de (Gaviria López & Mazuera García, 2010) mediante el cual se realizó la etapa de venteo y esterilización. En esta última se subió la temperatura lo más rápido posible hasta alcanzar la requerida en el proceso. Posteriormente el producto fue enfriado en un freezer a 4 °C hasta alcanzar una temperatura promedio de 30°C, los enlatados de arveja fueron conservados en refrigeración para ser analizados por HPLC-PDA en base a la metodología planteada.

4.7 ANÁLISIS DE LOS FUNGICIDAS POR UHPLC-MS

Siguiendo la metodología descrita en apartado 4.4.2. Se obtuvieron 2 extractos de arveja enlatada y escaldada, se realizó *el clean up* mediante una doble filtración con filtros GHP de 0.45µm y se almacenaron en viales ámbar de 1.5 mL ambas fueron analizadas por UHPLC.MS.

La preparación de las muestras se llevó a cabo por inyección directa de los extractos en el equipo cromatográfico, previa agitación en shaker y filtración. Los extractos se analizaron en un cromatógrafo de líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una unidad de desgasificación de disolvente al vacío (G1379B), una bomba binaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B) y una unidad termostada para la columna (G1316A). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna C₁₈ Kinetex (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.; 100 × 4,6 mm d.i., 2.6 µm de tamaño de partícula) a 40 °C. La fase móvil fue una solución acuosa al 0,2% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,2% (B). La condición inicial de gradiente fue de 95% de A y 5% de B cambiando linealmente hasta 10% de B (3 min), luego 20% de B (5 min) y 80% de B (10

min); se mantuvo durante 5 min; cambió a 100% de B (5 min) y se mantuvo durante 5 min; el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min; el tiempo total de la corrida fue de 40 min.

El flujo fue de 0,2 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 4 µL. El cromatógrafo líquido se acopló a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS 6210 series; AT, Palo Alto, CA, EE.UU.) a través de una interface de electronebulización (ESI) en modo positivo. Se usó nitrógeno como gas secante (350°C, 7 L min⁻¹) y gas nebulizador (40 psi). El voltaje del capilar fue de 1000 V, fragmentador 200 V, skimmer 65 V y el voltaje del octopolo 1 fue de 250 V.

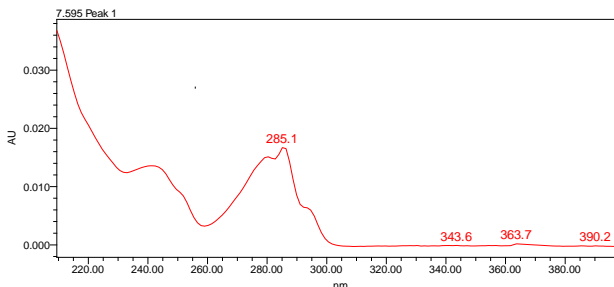
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DE CARBENDAZIM Y BENOMIL MEDIANTE HPLC CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA

Para este estudio se utilizaron soluciones de MBC y BEH, debido a que presentan propiedades de absorción en la región del espectro UV-vis; Para el correcto análisis de estas soluciones mediante la técnica HPLC se hace necesario la aplicación de etapas previas como preparación de la muestra, extracción de residuos y clean up mediante QuEChERS, antes de la inyección en el sistema. Inicialmente se realizaron ensayos para determinar los parámetros característicos de los compuestos a analizar.

5.1.1 Espectros UV-vis.

Los metil benzimidazol carbamatos presentan espectros característicos para compuestos aromáticos heterocíclicos que absorben en la región del UV-vis en un rango entre 280 y 295 nm, con un λ_{\max} de 285.1 nm para el Carbendazim y 293.4 nm para el Benomil (Ibarz, Garvín, Pagán, & Ibarz, 2015), en la figura 17 se pueden observar los espectros característicos de estos compuestos.



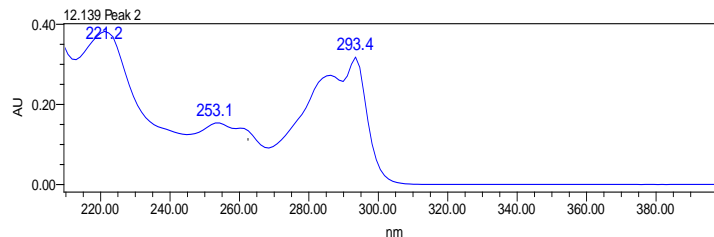


Figura 17. Espectros UV-vis de MBC (rojo) y BEH (azul), Fuente: esta investigación.

5.1.2 Identificación de los compuestos MBC y BEH mediante HPLC con estándares.

La identificación de BEH y MBC se llevó a cabo mediante HPLC-PDA, utilizando una columna C₁₈ con sistema de integración y recolección de datos EMPOWER II a una temperatura de horno de 30°C bajo las condiciones anteriormente mencionadas en la metodología. Se utilizó un gradiente ACN: Agua como fase móvil óptima, a un flujo de 1mL/min y un volumen de inyección de 20μL. En la figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos a la longitud de onda (λ) 285 nm, se pueden identificar MBC y BEH mediante sus t_R siendo 8.1 y 12.1 min respectivamente, su orden de elución es resultado de la disminución de polaridad MBC > BEH.

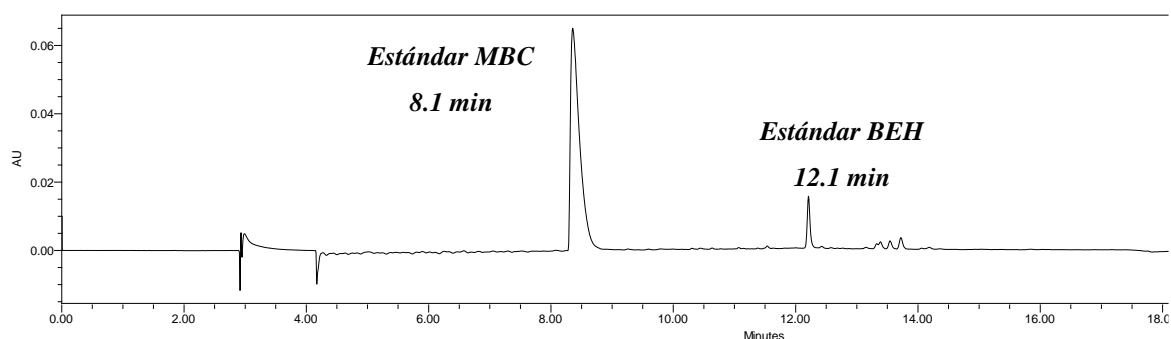


Figura 18. Cromatograma de una mezcla de estándares de MBC y BEH mediante HPLC-UV, 5 mg/L a λ 285 nm. Fuente: esta investigación.

5.1.3 Idoneidad del sistema

La idoneidad del sistema se evaluó mediante, resolución, el factor de capacidad y el número de platos teóricos (tabla 14), obtenidos a partir de 5 inyecciones del estándar MBC + BEH a una concentración de 5 mg/L y cumpliendo con las especificaciones establecidas en (A.E.F.I., 2001).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la idoneidad del sistema se presentan a continuación.

Tabla 14. Datos de idoneidad del sistema para MBC, Fuente: esta investigación.

Inyección	Área (mV/min)	Tiempo de retención (min)	K'	Platos teóricos	Resolución
1	726360	8.500	2.380	2235	7.660
2	745252	8.380	2.300	2350	8.450
3	756940	8.380	2.300	2223	8.250
4	752730	8.380	2.300	2353	8.480
5	743602	8.370	2.290	2223	8.330
Promedio	744976	8.420	2.310	2276	8.230
S	11745.0	0.090			
%CV	1.5700	1.100			

Nota: límites de confianza al 95% del tiempo de retención: 7.69-8.51

Según la tabla 14 de criterios permitidos se demuestra que el sistema es confiable y se puede utilizar para la validación de la metodología y análisis de los compuestos sometidos al estudio debido a que cumple con los criterios de aceptación, los platos teóricos son >2000, el factor de capacidad es >2, la resolución es >2 y el coeficiente de variación de áreas y tiempos de retención es < 2%, teniendo en cuenta que se permite un intervalo no mayor al 10% el tiempo de retención del MBC está en el rango de 7.69 a 8.51 min.

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

5.2.1 Selectividad.

A continuación se presentan los ítems utilizados para evaluar selectividad, los cromatogramas obtenidos y la detección de señales medibles, para confirmar y evaluar la identidad de los analitos se tuvo en cuenta el t_R y el espectro de absorción UV.

5.2.1.1 blanco de solvente.

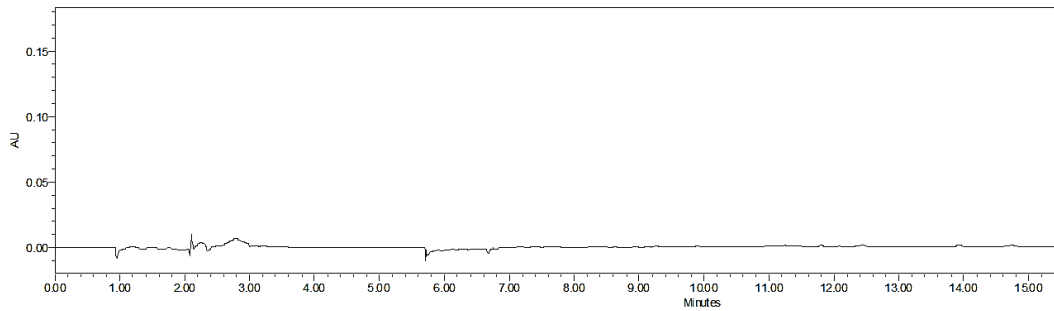


Figura 19. Cromatograma de blanco de Acetonitrilo. Detección 285nm. Fuente: esta investigación.

En la figura 19 cromatograma de Acetonitrilo (blanco) no se observan señales significativas cercanas a los analitos de interés que se encuentran a 8.1 y 12.1 min.

5.2.1.2 hidrolisis ácida.

Tanto BEH como MBC y componentes que hacen parte de la matriz del extracto de arveja fueron sometidos a hidrolisis ácida con el fin de descartar posibles interferentes cercanos a las señales de los analitos de interés que se puedan formar con estas condiciones. Para ello se empleó extractos de los fungicidas a concentraciones en base con la curva de calibración, se realizó una hidrólisis ácida.

5.2.1.2.1 Carbendazim.

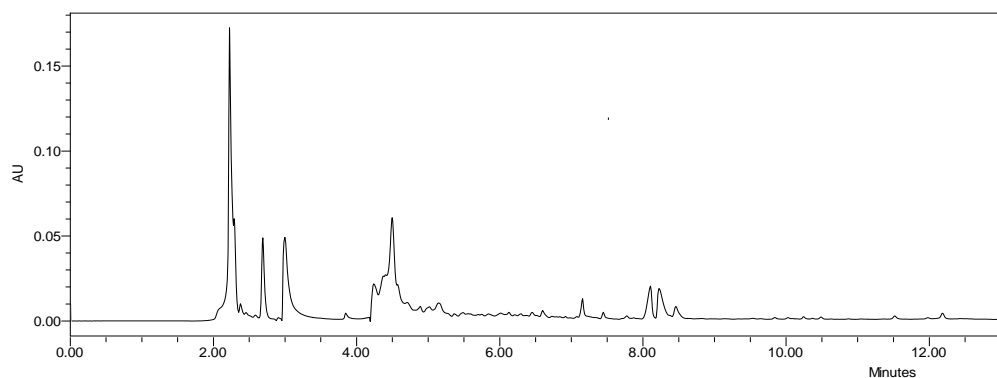


Figura 20. Cromatograma de Carbendazim a 1mg/L y luego acidificada. Detección a 285 nm. Fuente: esta investigación

En la figura 20 se muestra el cromatograma correspondiente a la hidrólisis ácida, presenta 5 señales; a los 8.2 minutos aproximadamente aparece la señal correspondiente al Carbendazim, a los 7.2, 8.1, 8.4 y 12.2 minutos aproximadamente aparecen las señales correspondientes a compuestos presentes en la matriz del extracto de arveja (ver anexo A.1), no se observan picos que correspondan a una posible degradación del Carbendazim y este mantiene su concentración inicial de 1 mg/L de acuerdo a la curva de calibración con un área de 157585 mV/s.

5.2.1.2.2 Benomil.

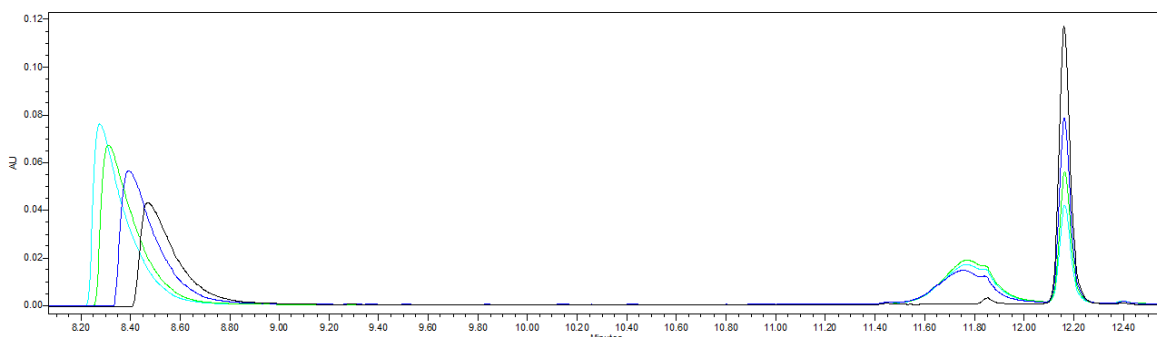


Figura 21. Comparación de cromatogramas de soluciones de Benomil acidificadas. Detección a 285 nm. fuente: esta investigación

En el cromatograma correspondiente a la hidrólisis ácida de Benomil, figura 21, se presentan 3 señales; en el rango de 8.2 a 8.5 minutos aproximadamente aparece las señales correspondiente a la conversión de Benomil a Carbendazim, a los 11.6 minutos aproximadamente aparece una señal correspondiente a componente de la matriz determinado por UV (ver anexo A.1) y a 12.4 minutos aproximadamente aparece la señal correspondiente a Benomil, en disolución acuosa y pH ácido (4,25) BEH se transforma rápidamente en MBC con un tiempo de vida medio de 2 horas siendo el único producto de degradación de Benomil a estas condiciones (Hershberger, 1993). Por ello todos los análisis reportados en la literatura para estos dos fungicidas se determinan de manera conjunta como MBC total.

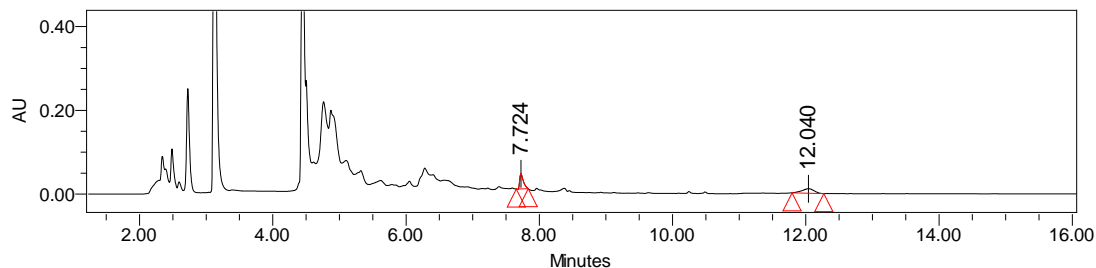


Figura 22. Confirmación de transformación BEH a MBC. Fuente: esta investigación.

El extracto fortificado con Benomil al cabo de 1 hora con tratamiento térmico a 80°C y acidificado bajo el método indicado anteriormente para determinar este compuesto (4.4.2) fue analizado por HPLC-PDA y se puede observar en la figura 22 que no se detectó presencia de Benomil ya que no se observa ninguna señal al tiempo de retención (12.04 min). Por el contrario se obtuvo la señal correspondiente al Carbendazim a los 7.72 min, lo cual confirma que la hidrólisis fue efectiva.

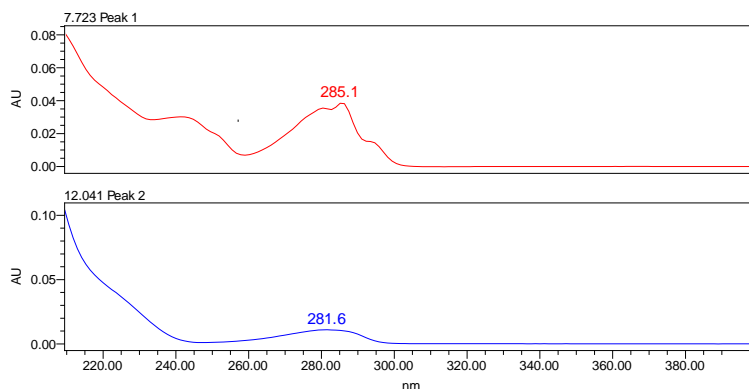


Figura 23. Espectros UV de la hidrolisis. Rojo (MBC) azul señal cercana a (BEH). Fuente: esta investigación.

5.2.1.3 evaluación de los excipientes.

Los cromatogramas correspondientes a los excipientes muestran señales que se pueden diferenciar por tiempo de retención y espectro UV de los analitos de interés, por tal razón, no interfieren con

la cuantificación de estos, siendo la señal a 8.2 min correspondiente a Carbendazim en el (anexo A.3) se encuentran los espectros UV que descartan a las otras señales.

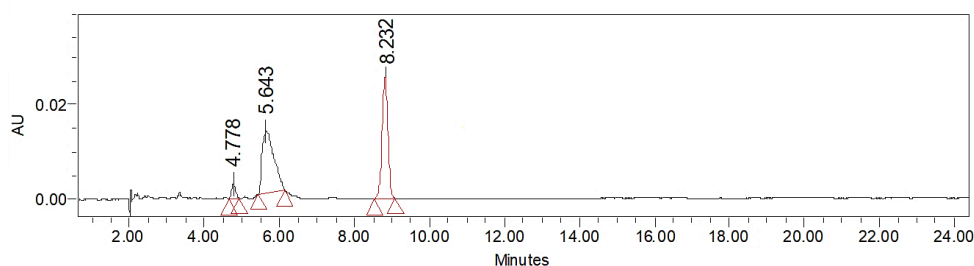


Figura 24. Cromatograma de señales de los excipientes en producto comercial de MBC. Detección a 285 nm. Fuente: esta investigación.

5.2.1.4 evaluación del efecto matriz.

El cromatograma correspondiente al efecto matriz, Figura 25, presenta 4 señales significativas en el rango de 7.4 a 8.4 min cercanas a la señal del MBC; a los 7.4, 7.7, 8.2 y 8.4 minutos aproximadamente aparecen las señales correspondientes a componentes de la matriz, la señal que aparece a los 8.0 min corresponde a la fortificación de MBC analizado por UV, los espectros se pueden ver (anexo A.4) ninguna de las señales correspondientes a la matriz interfieren en la cuantificación y determinación del MBC.

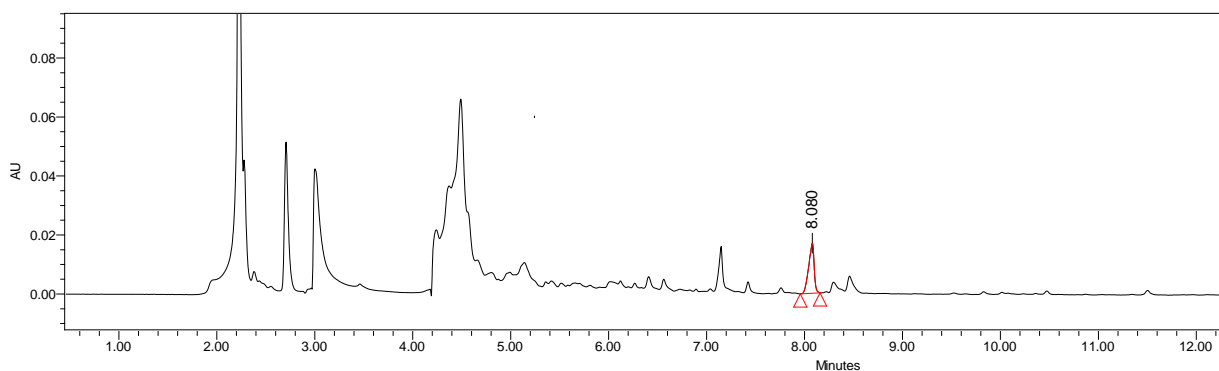


Figura 25. Cromatograma de señales cercanas a MBC en extracto de muestras de arveja, Detección 285 nm. Fuente: esta investigación.

5.2.2 Efecto del pH y la temperatura en estándares de los fungicidas.

Se evaluaron dos factores determinantes que podrían ser críticos en el desarrollo del método, y se hicieron variaciones en los valores establecidos en la validación, analizando la influencia de cada factor sobre el porcentaje de recuperación de los analitos para evaluar si un parámetro tenía influencia significativa sobre

este, de acuerdo a lo descrito en los procedimientos de (Hershberger, 1993) y (Molina, 2012), donde se establecieron límites en las variaciones de pH y temperatura para el análisis de MBC.

5.2.2.1 efectos del pH.

La variación en los niveles se estableció utilizando la metodología descrita en el apartado 4.5.4.1

Los porcentajes de recuperación se determinaron frente al valor promedio del estándar a concentración 1 mg/L que se trabajó a las condiciones propuestas como nivel medio.

Tabla 15. Efecto del pH en el MBC. Fuente: esta investigación.

Concentración mg/L	Nivel de pH	Área mV/s	Promedio	% Recuperación
1	Alto	156688	157348	98.05
	6	158007		
	Medio	160779	160470	100.0
	4.25	160162		
	Bajo	159225	158899	99.02
	3	158572		
			%CV	0.980

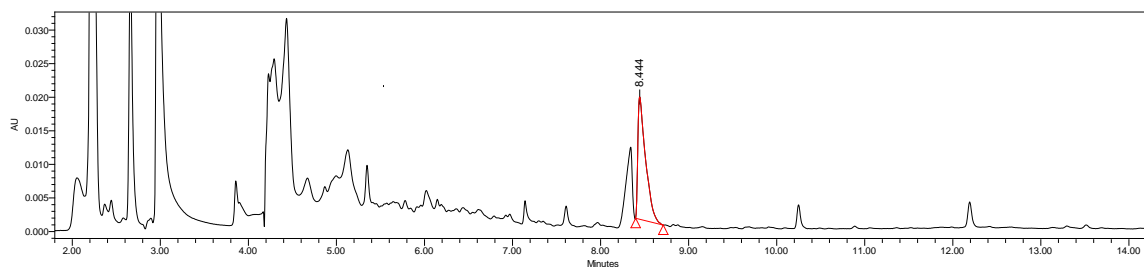


Figura 26. Cromatograma pH nivel bajo mezcla MBC + BEH. Fuente: esta investigación.

En la tabla 15 se pueden observar los porcentajes de recuperación obtenidos para la variación en el pH en soluciones 1 mg/L de MBC+BEH, como se explicó en el apartado 5.2.1.2 de selectividad el Benomil en condiciones acidas se degrada totalmente en Carbendazim por lo que no se observan señales relacionadas a este fungicida (ver figura 26 y anexo G.1), por otra parte el MBC total determinado presenta recuperaciones sin diferencias significativas según el coeficiente de variación, por lo que se puede decir que las variaciones al pH en estos niveles no afectan la determinación de MBC total.

5.2.2.2 efectos de la temperatura.

De igual forma que con el pH se establecieron niveles de variación a la temperatura como se muestran a continuación.

Los porcentajes de recuperación se determinaron frente al valor promedio del estándar a concentración 1 mg/L que se trabajó a las condiciones propuestas como nivel medio con un área de 160470 mV/s.

Tabla 16. Efecto de la temperatura en el MBC. Fuente: esta investigación.

Concentración mg/L	Nivel de T	Área mV/s	Promedio	% Recuperación
1	Alto	12139	18014	11.225
	120°C	11750		
	Medio	158848	158927	99.038
	90°C	159007		
	Bajo	136380	136125	84.828
	0°C	135870		

El nivel bajo de la variación de temperatura representa la mezcla sin tratamiento térmico, lo que lleva a degradación incompleta del BEH en MBC como se puede observar en la figura 27 al minuto 12.18 se presenta la señal correspondiente al BEH (ver anexo G.2) como resultado a esto el área de MBC total se ve disminuida en comparación al área obtenida de MBC total en el nivel medio.

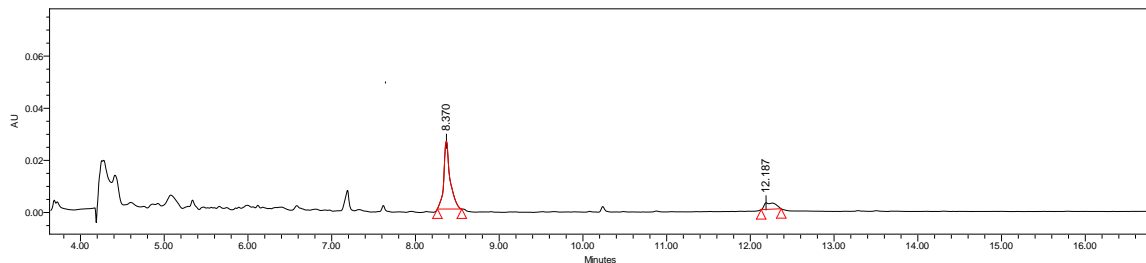


Figura 27. Cromatograma de temperatura nivel bajo, mezcla MBC + BEH. Fuente: esta investigación.

En nivel medio representa 10 grados por encima del requerido para que se lleve a cabo la transformación total de BEH en MBC por lo que no se observan señales correspondientes a BEH como se puede observar en la figura 28 (ver anexo G.2 para corroborar espectro UV) además de esto no se evidencia degradación de MBC total mostrando un porcentaje de recuperación de 99% con respecto al área del estándar a esta misma concentración.

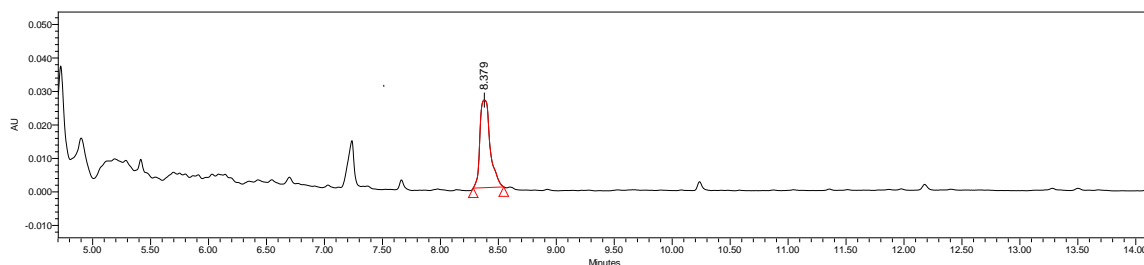


Figura 28. Cromatograma de temperatura nivel alto, mezcla MBC + BEH. Fuente: esta investigación.

El nivel alto representa 40 grados por encima del requerido para que se lleve a cabo la transformación total de BEH en MBC, esta temperatura se maneja durante el tratamiento 3 del procesamiento de la muestra (enlatado) y es donde se observa la mayor degradación de MBC, se debe tener en cuenta que el punto de ebullición del MBC en solución es $> 100^{\circ}\text{C}$ donde inicia su descomposición, por lo que se obtiene tan solo un 11% de recuperación con respecto al área del estándar a esta misma concentración.

5.2.3 Linealidad.

5.2.3.1 linealidad del sistema.

Se empleó el método de patrón externo para llevar a cabo la cuantificación, se preparó una curva de calibración utilizando una solución madre a partir del estándar de MBC y disueltas en acetato de etilo a concentraciones de 0.01; 0.05; 0.10; 0.50; 1.00 y 5.00 mg/L y se inyectaron por duplicado cada una de ellas. En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 17. Datos de linealidad del sistema. Fuente: esta investigación.

CONCENTRACIÓN (mg/L)	REPLICA	ÁREA mV/s	PROMEDIO	%RSD
-------------------------	---------	--------------	----------	------

0.01	1	1615	1628	1.17
	2	1642		
0.05	1	7547	7618	1.32
	2	7689		
0.10	1	20327	20064	1.85
	2	19801		
0.50	1	80192	80196	0.007
	2	80200		
1.00	1	160779	160470	0.27
	2	160162		
5.00	1	800050	792714	1.31
	2	785378		

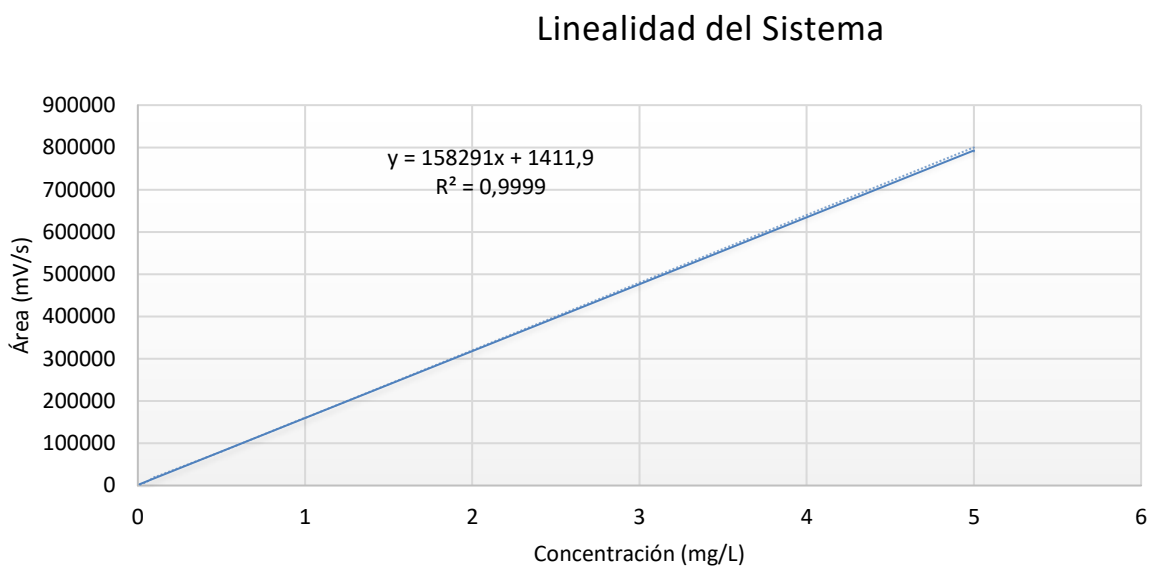


Figura 29. Curva de calibración del estándar Carbendazim. Fuente: esta investigación.

La ecuación del modelo de regresión simple lineal resultó:

$$y = 158291x + 1411,9 \text{ Ecuación 7}$$

Esta ecuación permite predecir valores de áreas en función de valores de concentración de MBC entre valores de 0.01 y 5.00 mg/L.

El coeficiente de determinación indica que el modelo ajustado explica 99.9857% de la variabilidad en el área. El coeficiente de correlación es igual a 0.999929, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables, por tanto evidencia un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones entre 0.01 a 5.00 mg/L para MBC.

Para asegurar la linealidad de la curva se hace necesario realizar un contraste con el indicador estadístico T de student, asumiendo que la hipótesis nula H_0 su correlación es igual a cero, en otras palabras no existe correlación entre las variables, en la hipótesis alternativa H_1 debe existir correlación entre las variables; esto quiere decir que si el valor de $T_{\text{observado}}$ es mayor que el T_{tabulado} , se rechaza H_0 y se concluye que la correlación es significativa (Quattrocchi & Abelaira, 1992).

Tabla 18. Prueba t de Student para la linealidad del sistema. Fuente: esta investigación.

PARÁMETRO	HIPÓTESIS NULA	t observado	t tabulado	CONCEPTO
Intercepto (a)	$H_0: \alpha = 0$	1.13	2.22	Se acepta la hipótesis nula
Pendiente (b)	$H_0: \beta = 0$	264.69	2.22	Se rechaza la hipótesis nula

Tabla 19. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del sistema. Fuente: esta investigación.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F exp	F tab
Regresión	1	9.45617E+11	9.45617E+11	70061.71	5.12
Falta de ajuste	4	2.69963E+7	6.74907E+6		
Error puro	6	1.07973E+8	1.79955E+7		
Error residual	10	1.34669E+8	1.34669E+7		
Error total	11	9.45752E+11			

Como se muestra en la tabla 18, la prueba t para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad indica que estadísticamente hay proporcionalidad entre la concentración y la respuesta analítica para el rango comprendido entre 0.01 y 5.00 mg/L. También indica que la pendiente es estadísticamente diferente a cero y el intercepto no es estadísticamente diferente a dicho valor. Todo lo anterior indica que los errores sistemáticos no afectan la linealidad del método y que esta es descrita por el modelo lineal propuesto.

La tabla 19, donde se muestran las pruebas F y ANOVA para evaluar la regresión y el desvío de la linealidad, indica que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones y se demostró que hay regresión significativa entre la concentración y el área y no hay desvío de la linealidad.

La figura 29. Representa la curva de calibración para la linealidad del sistema. En ella se puede apreciar la proporcionalidad entre la concentración y la respuesta analítica para el rango comprendido entre 0.01 y 5.00 mg/L, lo que se corrobora con los resultados expuestos en las tablas 18 y 19. En el anexo C.1 se pueden corroborar los análisis estadísticos obtenidos del programa Statgraphics centurión.

Tabla 20. Prueba G de Cochran. Fuente: esta investigación.

G experimental	G tabulado
0.53	0.78

En la tabla 20 se muestra el análisis complementario para linealidad, la prueba G de Cochran indica que si $G_{\text{experimental}}$ es menos que el G_{tabulado} las variancias de las concentraciones son homogéneas es decir que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados, por otra parte se observa en la tabla 17 que la desviación estándar relativa (RSD) en las diferentes concentraciones es inferior al 2% para el parámetro cromatográfico (área), el promedio de los valores de t_R es 8.348 y su %RSD es inferior al 1% lo que indica una buena precisión en la medición de la linealidad del sistema, en los anexos D y E se pueden verificar los análisis completos para estas dos pruebas.

5.2.3.1 linealidad del método.

De la misma manera que se evaluó la linealidad del sistema se llevó a cabo la linealidad del método fortificando muestras libres de fungicidas utilizando el estándar de MBC en un rango de concentraciones de 0.01; 0.05; 0.10; 0.50; 1.00 y 5.00 mg/L y se inyectaron por triplicado cada una de ellas. En la tabla 21 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 21. Datos de linealidad del método. Fuente: esta investigación.

CONCENTRACIÓN	REPLICA	ÁREA	PROMEDIO	%R	%RSD
----------------------	----------------	-------------	-----------------	-----------	-------------

(mg/L)		mV/s				
	1	1621				
0.01	2	1625	1605	98.58	1.918	
	3	1569				
	1	7469				
0.05	2	7455	7501	98.46	0.899	
	3	7580				
	1	19269				
0.10	2	19803	19579	97.58	1.383	
	3	19667				
	1	77618				
0.50	2	78101	77606	96.77	0.624	
	3	77099				
	1	156302				
1.00	2	159822	158135	98.54	1.099	
	3	158281				
	1	789336				
5.00	2	787262	781839	98.62	1.417	
	3	768920				

Nota: %R = porcentaje de recuperación comparado con la linealidad del sistema.

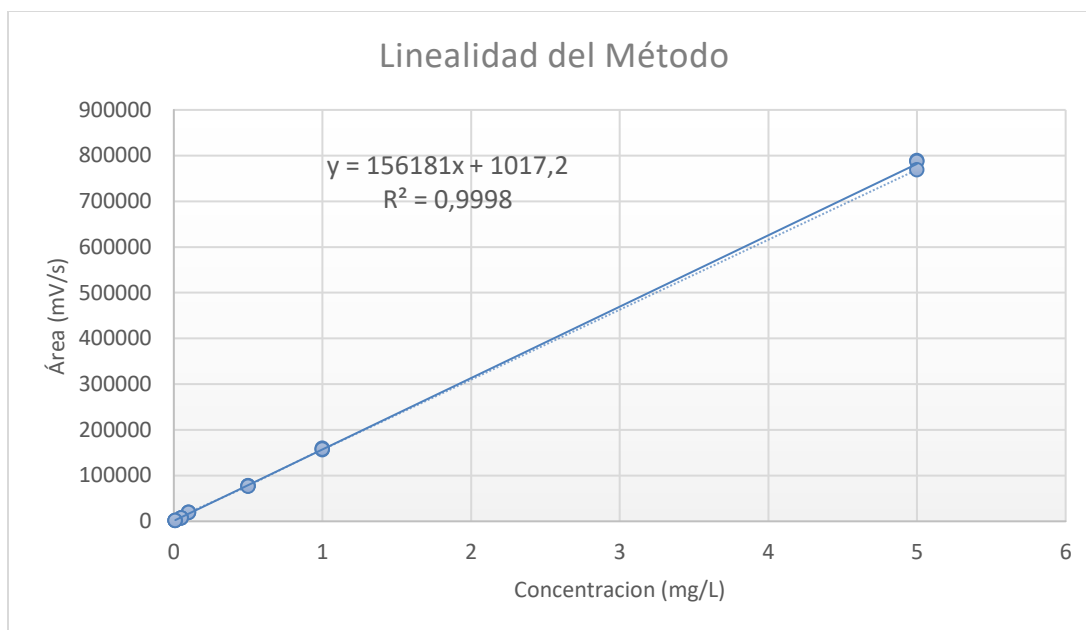


Figura 30. Curva de calibración del método. Fuente: esta investigación.

La ecuación del modelo de regresión simple lineal resultó:

$$y=156181x+1017.2 \text{ Ecuación 8}$$

Se obtuvo un coeficiente de determinación con valor de 99.98% indicando una relación fuerte entre las variables, por tanto evidencia un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones entre 0.01 a 5.00 mg/L para el método.

Se realizó la prueba T de Student, teniendo en cuenta las mismas hipótesis propuestas en la linealidad del sistema.

Tabla 22. Prueba t de Student para la linealidad del método. Fuente: esta investigación.

PARÁMETRO	HIPÓTESIS	t observado	t tabulado	CONCEPTO
	NULA			
Intercepto (a)	$H_0: \alpha = 0$	1.13	2.11	Se acepta la hipótesis nula
Pendiente (b)	$H_0: \beta = 0$	264.69	2.11	Se rechaza la hipótesis nula

Tabla 23. Prueba F de Fisher y ANOVA para la linealidad del método. Fuente: esta investigación.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F exp	F tab
---------------------	--------------------	-------------------	------------------	-------	-------

Regresión	1	1.38085E+12	1.38085E+12	72928.81	4.54
Falta de ajuste	4	4.35389E+7	1.08847E+7		
Error puro	12	2.59409E+8	2.16174E+7		
Error residual	16	3.02948E+8	1.89343E+7		
Error total	17	1.38116E+12			

Como se muestra en la tabla 22, la prueba t para un nivel de confianza del 95% y n-2 grados de libertad indica que estadísticamente hay proporcionalidad entre la concentración y la respuesta analítica para el rango comprendido entre 0.01 y 5.00 mg/L y los errores sistemáticos no afectan la linealidad del método.

La tabla 23, donde se muestran las pruebas F y ANOVA, indica que estadísticamente no hay dispersión de los resultados entre réplicas para las distintas concentraciones siendo F_{exp} mucho mayor que F_{tab} y por tanto no hay desvío de la linealidad del método.

Los análisis estadísticos obtenidos en el programa Statgraphics para la linealidad del método corroboran que la matriz de arveja no representa interferencia ni proporciona error a la respuesta analítica para el rango evaluado.

La figura 30. Representa la curva de calibración para la linealidad del método. En el anexo C.2 se pueden corroborar los análisis estadísticos obtenidos del programa Statgraphics centurión.

5.2.4. Límites de detección y cuantificación.

Para calcular los límites de detección y cuantificación, se utilizaron las ecuaciones 7 y 8.

La pendiente se obtuvo a partir de la curva de calibración área vs concentración, usando como blanco ACN y midiendo el ruido en el intervalo del tiempo cercano a las señales del analito de interés.

Los valores obtenidos de LOD y LOQ para MBC son 0,0019 y 0,0064 mg/L respectivamente, los valores de estos límites son menores que los LMR, demostrando que la metodología tiene sensibilidad adecuada para el análisis de estos fungicidas en la arveja a este nivel.

Evaluando otra manera de calcular los límites se realizó una curva de calibración con las menores concentraciones de analito inyectándolas por duplicado obteniéndose una nueva recta de

calibración la cual es extrapolada a cero arrojando un estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}) seguidamente se determina la desviación estándar correspondiente a cada una de las mediciones, luego se calculó la recta (concentración vs desviación estándar) dando como resultado la desviación estándar del blanco (S_{bl}). En la tabla 24 se muestran los resultados de los límites calculados utilizando las expresiones indicadas en el apartado 4.5.5 que corroboran la sensibilidad del método.

Tabla 24. Evaluación de LOD y LOQ por calibrado. Fuente: esta investigación.

Concentración (mg/L)	Área mV/s	S	Y_{bl}	S_{bl}	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
0.01	1615	19,09				
0.01	1642					
0.05	7547	100,41	1250,9	48,58	0,0039	0,0048
0.05	7689					
0.10	20327	371,94				
0.10	19801					

5.2.5 Precisión.

5.2.5.1 repetibilidad del sistema.

La repetibilidad del sistema se evaluó conjuntamente con los datos proporcionados en el apartado 5.1.3 de idoneidad del sistema representado en la tabla 14 esto debido a que se analizó una solución estándar a una concentración de 5.00 mg/L con 5 repeticiones, el %CV obtenido presentó un valor de 1.57 para el área y 1.10 para el tiempo de retención estando ambos valores por debajo del criterio de %CV= 2, esto demuestra el sistema es preciso para llevar a cabo el análisis.

5.2.5.2 precisión del método.

La precisión del método se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad (precisión intermedia) en el rango de calibración con 6 réplicas para cada uno, en la evaluación de repetibilidad se realizó los experimentos el mismo día bajo las mismas condiciones, mientras que para la evaluación de la precisión intermedia se realizaron los experimentos en diferentes días y con diferente analista. Se fortifico extractos de blanco de matriz a partir de una disolución estándar al nivel de concentración

de 5.00 mg/L, se realizó el proceso de extracción, limpieza y análisis cromatográfico descrito en el apartado 4.4.2 de metodología. La dispersión de los resultados se expresó como %RSD.

Tabla 25. Repetibilidad del método. Fuente: esta investigación.

Inyección	Área mV/s
1	723112
2	728488
3	721719
4	732899
5	727210
6	726884
Desviación	3990.00
Promedio	726718
%RSD	0.54904

En la tabla 25 se presentan los valores obtenidos para la precisión en términos de repetibilidad, donde se observa que el valor de la desviación estándar relativa (RSD) para el sistema es inferior al 2% (0.55), lo que indica que el método es preciso desde el punto de vista de la repetibilidad.

Tabla 26. Reproducibilidad del método, precisión intermedia. Fuente: esta investigación.

Concentración (mg/L)	ÁREAS		
	Analista	Día 1	Día 2
5	1	713844	642442
		762781	663829
		707692	682121
	2	684723	672478
		684358	636176
		623390	683646

Tabla 27 Prueba F de Fisher y ANOVA para la precisión intermedia. Fuente: esta investigación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F_{exp}	F_{tab}
Analista	1	2.94339E+9	2.94339E+9	2.78	5.12
Día	1	3.20447E+9	3.20447E+9	3.03	5.12
Error	9	9.52958E+9	1.05884E+9		
Total	11	1.56774E+10			

Como se muestra en la tabla 27, el análisis de varianza para los resultados de la precisión intermedia, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre días o analistas, lo que indica que el método es preciso desde el punto de vista de reproducibilidad. Ver análisis estadístico completo en el anexo F.

Tabla 28. Determinación de %RSD intra e interdía Fuente: esta investigación.

Concentración (mg/L)	%RSD				%RSD interdía
	Día 1	Día 1	Día 2	Día 2	
5	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	
	4.14	5.31	2.99	3.77	4.73

En la tabla 28. Se presentan los %RSD obtenidos para la precisión intra e interdía, se puede evidenciar que los valores de %RSD son aceptables ya que son menores al máximo establecido por (AOAC, 2016) para trazas en concentraciones de 10 mg/L de analito, %RSD < 8%.

5.2.6. Exactitud.

La exactitud del método para la determinación de MBC total se evaluó mediante porcentajes de recuperación, las muestras se fortalecieron con una disolución de los estándares a los niveles de concentración de 0.01 a 5.00 mg/L de la curva de calibración, siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.5.7 antes de su inyección.

Tabla 29. Datos de la exactitud Fuente: esta investigación.

<i>Concentración teórica (mg/L)</i>	<i>Número de muestra</i>	<i>Área mV/s</i>	<i>Concentración hallada (mg/L)</i>	<i>% recuperación</i>
0.010	1	1621	0.009	99.52
	2	1625	0.009	99.77
	3	1569	0.009	96.24
0.050	1	7469	0.049	98.11
	2	7455	0.048	97.94
	3	7580	0.049	99.51
0.100	1	19269	0.094	94.97
	2	19803	0.098	98.35
	3	19667	0.097	97.49
0.500	1	76942	0.477	95.40
	2	76624	0.475	95.00
	3	76717	0.475	95.10
1.000	1	151081	0.945	94.50

	2	160650	1.005	100.5
	3	160976	1.008	100.8
	1	783478	4.940	98.80
5.000	2	807692	5.093	101.8
	3	765381	4.826	96.50

En la tabla 29 se presentan los resultados para exactitud obteniendo porcentajes de recuperación en un rango de 94.5 hasta 101.8% por lo cual son adecuados de acuerdo con lo establecido en los criterios de aceptación en la validación para el análisis de residuos de plaguicidas para concentraciones mayores a 1 mg/L (Ambrus, A. & Fajgeli, 2000).

Estos porcentajes de recuperación cercanos al 100% corroboran la adecuada extracción realizada por la técnica QuEChERS.

Tabla 30. Prueba T de student para exactitud. Fuente: esta investigación.

Promedio	97.79
Desviación estándar	1.474
Desviación estándar relativa	1.507
t_{exp}	4.382
t_{tab}	2.119

La exactitud se llevó a cabo con la prueba t de Student, con n-2 grados de libertad y p=0.05, estableciendo las siguientes hipótesis estadísticas: $H_0: t_{exp} \leq t_{tab}$ y $H_1: t_{exp} \geq t_{tab}$

Para la t de Student se puede apreciar que el valor calculado es mayor que el tabulado, se acepta entonces la hipótesis alternativa ($H_1: t_{exp} \geq t_{tab}$) es decir, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos y el 100%. (Ver tabla 30)

Tabla 31. Prueba G de Cochran para exactitud. Fuente: esta investigación.

Muestra	% R	% R	% R	% R	% R	% R
----------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

	[0,010 mg/L]	[0,050 mg/L]	[0,100 mg/L]	[0,500 mg/L]	[1.000 mg/L]	[5.000 mg/L]
1	99.52	98.11	94.97	95.03	94.55	99.05
2	99.77	97.94	98.35	95.43	100.5	101.8
3	96.24	99.51	97.49	95.15	100.8	96.19
Media	98.51	98.52	96.94	95.20	98.62	99.01
SD	1.969	0.861	1.756	0.205	3.520	2.810
CV	1.999	0.874	1.812	0.001	0.035	0.140
N	3	3	3	3	3	3
Varianza	3.880	0.742	3.085	0.040	12.43	7.870
G_{cal}				0.457		
G_{tab}				0.870		

En la tabla 31 se pueden apreciar los resultados para la prueba G de Cochran donde se muestra que existe homogeneidad entre las varianzas para los diferentes niveles de concentración, por lo tanto la concentración no afecta la variabilidad de los resultados.

Los resultados de la validación de la metodología por HPLC muestran que es selectiva, lineal, precisa y exacta, por lo tanto es confiable para ser utilizada en la determinación del fungicida Carbendazim.

5.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS

5.3.1 Procesamiento en planta piloto.

Las muestras de arveja fueron clasificadas según su tipo (Alcalá y San Isidro) comúnmente conocidas como PiquiNegra (PN) y PiquiBlanca (PB) respectivamente esto debido a la diferencia en el color de su hilum como se puede observar en la figura 31.



Figura 31. Grano de arveja de las variedades Alcalá y San Isidro. Fuente: esta investigación.

Su procesamiento fue llevado a cabo en la planta piloto de la Universidad Nariño, basándose en la metodología descrita por (Garrote et al., 2009) teniendo en cuenta que se realizó una división del procesamiento en las siguientes etapas para poder explicar los resultados en cada tratamiento:

T₀. El tratamiento inicial que se aplicó a las muestras fue un lavado con agua a temperatura ambiente.



Figura 32. Lavado manual de las muestras con agua Fuente: esta investigación.

T₁. El segundo tratamiento de las muestras fue un escaldado, El escaldado consistió en una primera fase de calentamiento de las muestras a una temperatura de 100°C durante 5 minutos. El último paso fue realizar un exhausting por un minuto entre 92 y 95°C.



Figura 33. Muestras de arveja durante y después del tratamiento de escaldado. Fuente: esta investigación.

T₂. El tercer tratamiento fue el enlatado, Una vez esterilizada la muestra se introdujo en una lata con el líquido de cobertura, su sellado se llevó a cabo en la cerradora hermetizando el producto, posterior a ello se llevó la lata a un autoclave donde se realizó la segunda esterilización esta vez aplicando presión y temperatura alrededor de 30 min y 120°C, se extrajeron las latas y se realizó un choque térmico en un freezer.



Figura 34. Muestras de arveja durante el tratamiento de enlatado. Fuente: esta investigación.



Figura 35. Muestras de arveja antes y después del enlatado. Fuente: esta investigación.

5.3.2 Cuantificación de fungicidas en las 2 variedades.

Una vez realizado el procesamiento de las arvejas se tomaron muestras de cada uno de los tratamientos y se le aplicó la metodología de extracción QuEChERS explicada en el apartado 4.4.2.2 y se analizaron los extractos de cada tratamiento por duplicado en el HPLC-PDA.

Para la identificación de los fungicidas BEH y MBC se compararon los tiempos de retención y los espectros UV obtenidos en el análisis cromatográfico de las muestras reales en comparación con los estándares.

Para cuantificar se utilizó el método de patrón externo en el cual se calcula la concentración por medio de una interpolación en la curva de calibrado que relaciona el área de los estándares con respecto a la concentración, mediante la ecuación 7 del apartado de linealidad.

En la tabla 32 y 33 se muestran los resúmenes de los resultados obtenidos para las variedades San Isidro y Alcalá.

Tabla 32. Cuantificación de MBC total en variedad San Isidro. Fuente: esta investigación.

TRATAMIENTO	ÁREA (mV/s)	CONCENTRACIÓN (mg/L)	LMR (mg/L)
T ₀	90752	0.56 >	0.01

T₁	44109	0.27 >
T₂	1571	0.01 ≤

Tabla 33. Cuantificación de MBC total en variedad Alcalá. Fuente: esta investigación.

TRATAMIENTO	ÁREA (mV/s)	CONCENTRACIÓN	
		(mg/L)	LMR (mg/L)
T₀	36526	0.220 >	
T₁	29412	0.170 >	0.01
T₂	765	0.004 ≤	

Los resultados que arrojan los cromatogramas en las figuras 36 y 37 (ver complemento en anexo H) indican la presencia de MBC total en las muestras durante las etapas de su procesamiento, como se puede observar en las tablas 32 y 33 la concentración del fungicida va disminuyendo a medida que se avanza en el procesamiento de la muestra, esto en gran medida se debe a que la temperatura provoca una degradación al MBC.

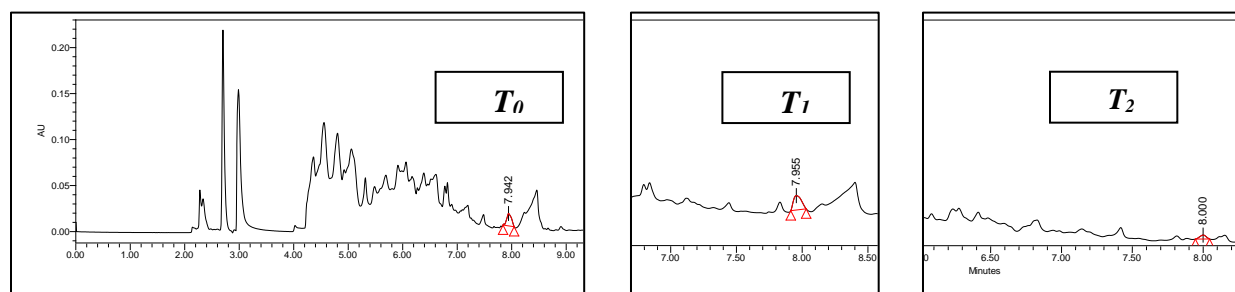


Figura 36. Cromatogramas de los extractos según sus tratamientos variedad San Isidro. Fuente: esta investigación.

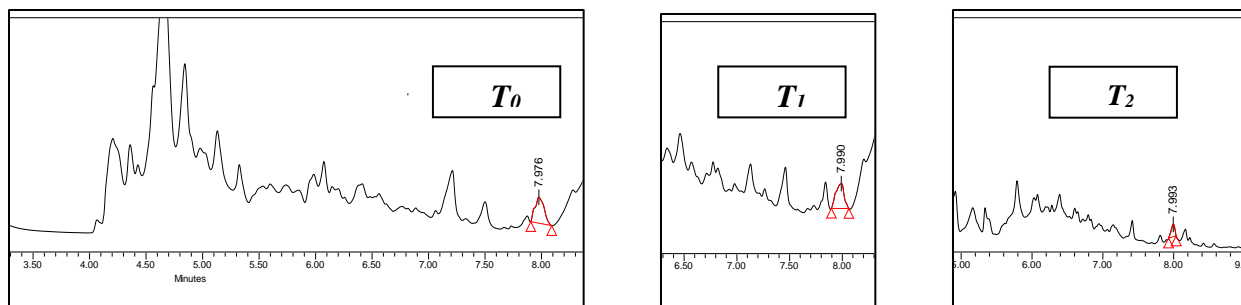


Figura 37. Cromatogramas de los extractos según sus tratamientos variedad Alcalá. Fuente: esta investigación.

En la primera etapa (T_0) se encontraron concentraciones de 0,56 y 0,22 mg/L para las dos variedades San Isidro y Alcalá respectivamente, indicando que después del tratamiento (T_0) se presentan concentraciones que sobrepasaron el LMR.

El tratamiento (T_1) representó una disminución en los niveles de concentración de MBC total sin que se llegaran a encontrar por debajo del LMR, mientras que el tratamiento final (T_2) dio como resultado que las muestras analizadas se encontraran a concentración cuantificable pero por debajo del LMR, haciendo del producto final (enlatado) apto según el *codex alimentarius* para su comercialización.

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, se observa en general, que la variedad San Isidro presenta mayor concentración de MBC total durante todo el procesamiento por lo que existe una mayor bioacumulación en las muestras de esta variedad con respecto a la Alcalá.

Los resultados de las tablas 32 y 33 confirman la persistencia de los fungicidas por encima de límites permisibles siendo insuficiente un lavado y escaldado para la eliminación total de los residuos.

Como análisis complementario a las muestras, se realizó el proceso de extracción y cuantificación a las vainas de las dos variedades para determinar el porcentaje de fungicida (MBC) remanente en estas al momento de la cosecha sin posterior procesamiento, para llevar cabo la cuantificación se utilizó de igual manera el método del patrón externo, teniendo como base la ecuación 9 obtenida de la curva de calibración de MBC total para vainas (ver anexo I)

$$Y=116679x + 140083 \text{ Ecuación 9}$$

En la tabla 34 se resumen los resultados en las dos variedades.

Tabla 34. Cuantificación de MBC total en las vainas de las dos variedades. Fuente: esta investigación.

Variedad	Área (mV/s)	Concentración (mg/L)	Porcentaje de residualidad
Alcalá	6592440	55.30	3.69%
San Isidro	4557758	37.86	2.52%

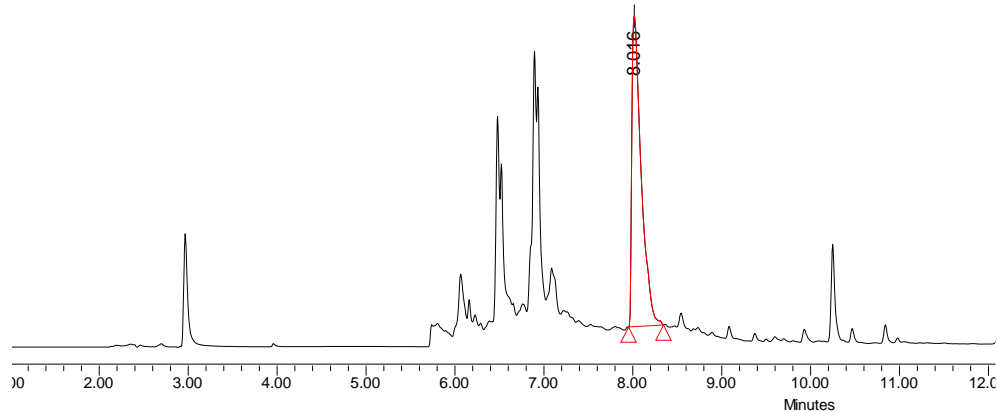


Figura 38. Cromatograma del extracto de las vainas de arveja. Fuente: esta investigación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 34 se puede observar que las concentraciones encontradas en los extractos de las vainas de arveja sobrepasan en gran medida los LMR y aunque estas no sean consumibles es notable la bioacumulación y persistencia que presentan, de acuerdo a las indicaciones de los productos comerciales de los fungicidas (BENZIL® 50 WP y TECNOMYL 500 SC) los agricultores nariñenses agregan un promedio de 1500 mg/L durante la siembra, crecimiento y cosecha de los cuales estas concentraciones representarían un 3.69 y 2.52% de residualidad en las vainas de las variedades Alcalá y San Isidro respectivamente.

Aunque el tiempo de vida media de algunos fungicidas puede ser muy corto se puede observar que algunos pueden ser muy persistentes en las plantas aunque no sean aplicados directamente, No obstante las concentraciones pueden ser pequeñas como se observaron en las tablas de resultados pero muy posiblemente se presente una bioacumulación lo cual hace que aumente la concentración gradualmente convirtiendo esto en un riesgo potencial para la salud humana y el medio ambiente teniendo en cuenta que estos desechos orgánicos son comúnmente utilizados como abonos o

incluso como alimento para animales y no existe un control de estos desechos que eliminen los residuos de estos fungicidas por lo que pueden ser contaminantes de fuentes hídricas y suelos.

5.4 ANÁLISIS DE LOS FUNGICIDAS Y PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN

MEDIANTE UHPLC-ORBITRAP-MS

Como complemento al estudio realizado en el HPLC-PDA, se llevó a cabo un análisis por UHPLC-MS para la identificación de MBC y sus productos de transformación en los extractos de arveja.

Los productos de transformación del BEH y MBC siguen la ruta de degradación presentada en la figura 39.

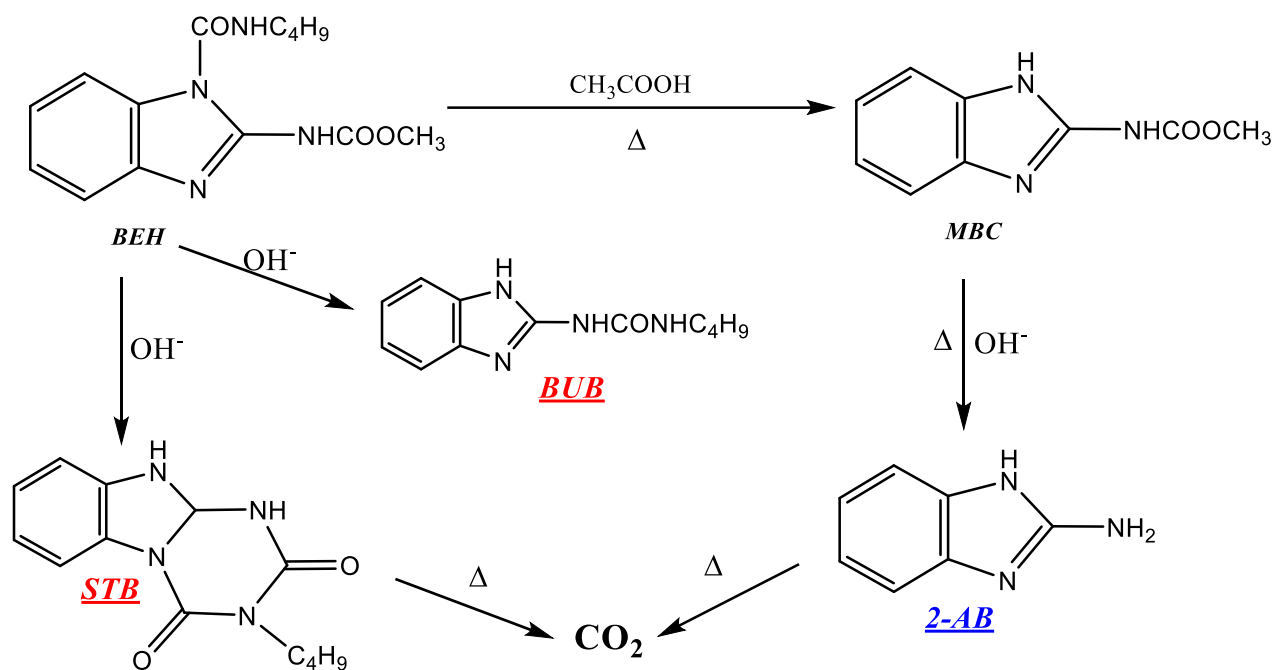


Figura 39. Ruta de degradación de BEH y MBC. Fuente: esta investigación.

La formación de los productos de transformación del Benomil (BUB y STB) es descartada pues anteriormente se llevó a cabo la transformación total de Benomil a Carbendazim por medio de hidrólisis ácida y calentamiento (ver apartado 5.2.1.2) teniendo en cuenta la ausencia de estos dos metabolitos el único producto de transformación que se pudo formar durante el proceso de enlatado fue el 2-AB debido a la temperatura en la que se llevó a cabo este procedimiento.

Considerando la figura 40 el Carbendazim da como producto de transformación al 2-AB siguiendo el mecanismo de reacción presentado a continuación:

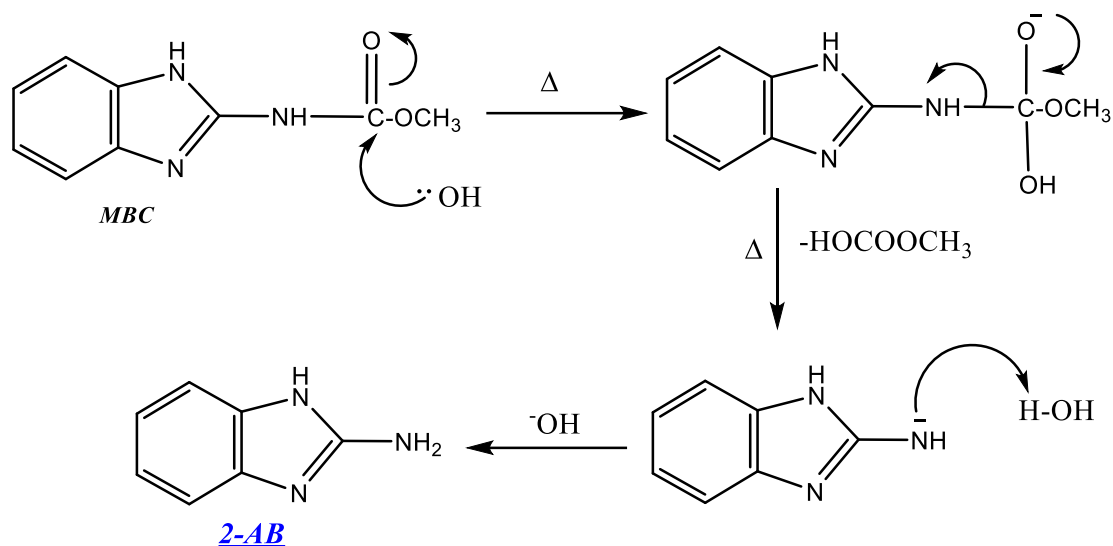


Figura 40. Mecanismo de transformación de MBC a 2-AB Fuente: esta investigación.

Al tener el Carbendazim una amida estable se requieren de condiciones como la alta temperatura en un periodo de tiempo largo para que se pueda dar la hidrólisis de la amida dando como producto de transformación a la amina que se encuentra en el 2-AB.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para este análisis son descritas en el apartado 4.7, Para la cuantificación del Carbendazim en los extractos, se empleó la técnica de estandarización externa. Para ello, se utilizó el factor de respuesta (R_f) establecido del análisis de la solución estándar del Carbendazim en diferentes concentraciones, según la ecuación 10 obtenida a partir de la curva de calibración con un R^2 de 0.9989

$$y = 2 \times 10^6 x + 5353.4 \quad \text{Ecuación 10}$$

En la Tabla 35, se reporta la concentración del Carbendazim determinada por cromatografía líquida de alta resolución con analizador de masas TOF (LC-ESI+-TOF-MS) en los extractos.

Tabla 35. Nivel mínimo de cuantificación (NMC), tiempo de retención (t_R) y concentración del Carbendazim presente en los extractos de arveja. Fuente: esta investigación.

Compuesto	t_R (min)	NMC mg/L	Concentración mg/L	
			Extracto T ₁	Extracto T ₂

Carbendazim	16.03	0.005	0.31	0.01
-------------	-------	-------	------	------

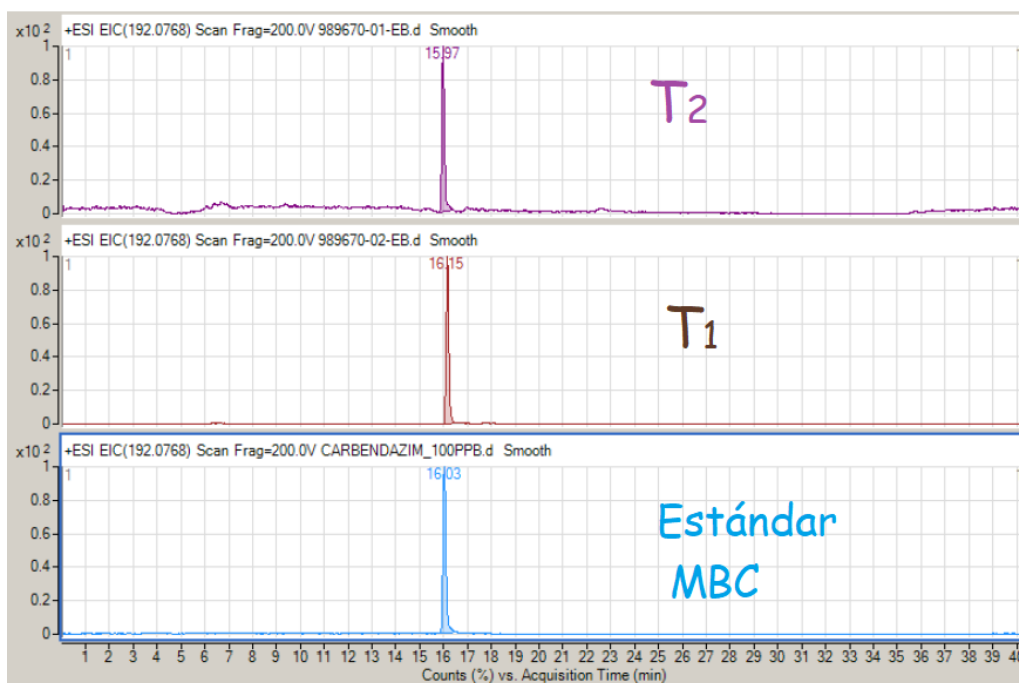


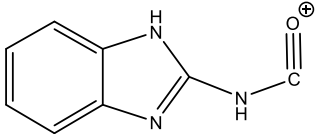
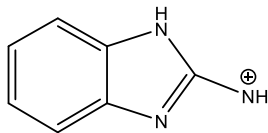
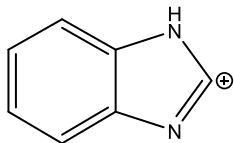
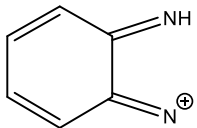
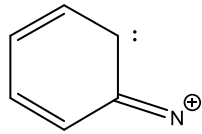
Figura 41. Cromatogramas UHPLC-MS de extractos de arveja de la variedad san Isidro y estándar de MBC. Fuente: esta investigación.

Según los resultados observados en la tabla 35 y la figura 41, el tiempo de retención del Carbendazim es de 16.03 min siendo el único analito presente en los extractos, descartando mediante la corrida cromatográfica en un rango de tiempo de 1 a 40 minutos la posible presencia de productos de transformación como el 2-AB, se confirma también la presencia de MBC tanto en el tratamiento 1 como en el 2, las concentraciones de 0.31 y 0.01 mg/L para el T₁ y T₂ respectivamente concuerdan con los resultados anteriormente obtenidos por el HPLC-PDA.

Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 1100 en modo SCAN para el posible monitoreo de productos de transformación, con una velocidad de adquisición de 2 espectros s⁻¹. Se realizó la corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución que incluye purina (C₅H₄N₄ a m/z 121,05087) y hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄ a m/z 922,00980).

A continuación en la tabla 36 se resumen las fragmentaciones típicas para el Carbendazim.

Tabla 36. Masa exacta de Carbendazim protonado y sus principales productos iónicos, fragmentaciones típicas del Carbendazim. Fuente: esta investigación.

Masa molecular	Ion precursor m/z	Producto ion m/z	Formula molecular	Estructura química
		160.05	$C_8H_6N_3O$	
		132.05	$C_7H_6N_3$	
191.20	192.07	117.04	$C_7H_5N_2$	
		105.04	$C_6H_5N_2$	
		90.03	C_6H_4N	

Teniendo en cuenta la tabla 36 se presenta a continuación el espectro de masas del estándar de Carbendazim

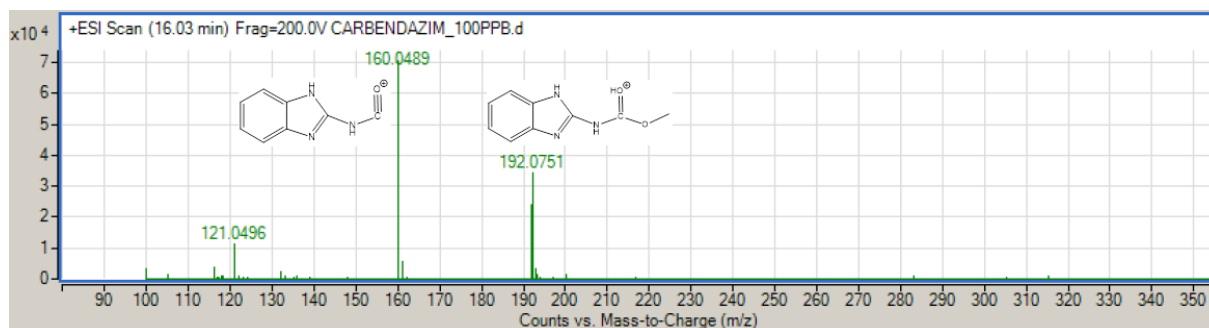


Figura 42. Espectro de masas del estándar de Carbendazim por UHPLC-MS ESI+. Fuente: esta investigación.

En el espectro de masas de la figura 42 aparecen 2 fragmentos principales, siendo el ion molecular principal de $m/z = 192.07$ correspondiente a la masa molecular del Carbendazim protonado $[M+H]^+$ también se revelo un segundo pico abundante, el fragmento de $m/z = 160.04$ corresponde a la pérdida del radical metoxilo a partir del ion principal con fórmula molecular $C_8H_6N_3O$ según (Grimalt, 2009).

Posteriormente se comparó el comportamiento de la fragmentación de la muestra estándar mediante UHPLC-MS con las muestras de los extractos de arveja escaldada y enlatada.

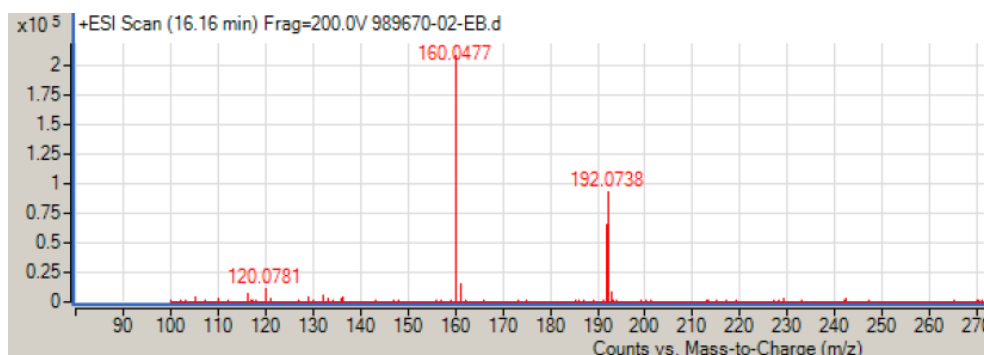


Figura 43. Espectro de masas del extracto de arveja sometido a T₁ por UHPLC-MS ESI+. Fuente: esta investigación.

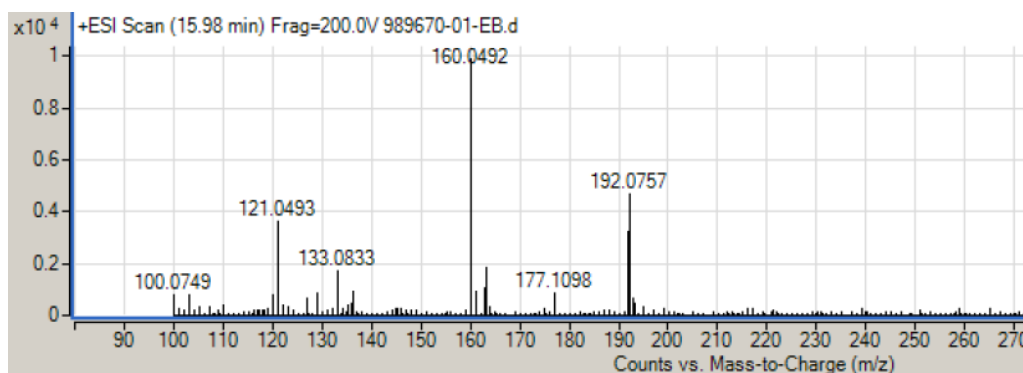


Figura 44. Espectro de masas del extracto de arveja sometido a T₂ por UHPLC-MS ESI+ Fuente: esta investigación.

Como lo muestran las figuras 43 y 44 al seleccionar como ion precursor al $m/z=192$ se encontraron los mismos fragmentos para el estándar de referencia y los extractos de arveja del T₁ y T₂ así como también se repite la distribución de la abundancia de las señales; por otra parte se descarta la presencia de señales que correspondan a los producto ion 132.05, 117.04, 105.04 y 90.03 m/z que son las fragmentaciones típicas del Carbendazim como se mencionó en la tabla 36 y se descarta también la presencia del producto de transformación 2-AB cuyo ion precursor tiene un $m/z =134$ que no se evidencia en los espectros de las figuras 43 y 44.

Con el fin de lograr una confirmación y comprensión total de los espectros se realiza el mecanismo de fragmentación de la señal más abundante.

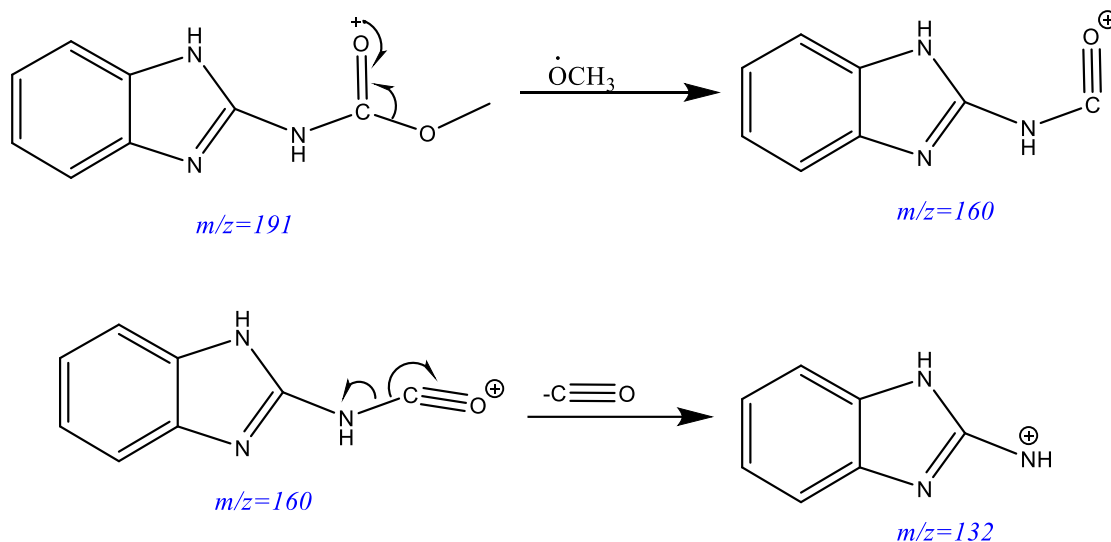


Figura 45. Mecanismo de fragmentaciones típicas del Carbendazim. Fuente: esta investigación.

Lo que se puede observar en la figura 45 en primera instancia es una ruptura α respecto al carbonilo del Carbendazim $m/z=191$ donde ocurre la pérdida del radical metoxilo, posteriormente este ion $m/z=160$ se vuelve a fragmentar perdiendo CO y dando como ion resultado el $m/z=132$, señales típicas de fragmentación del Carbendazim según (Grimalt, 2009).

La evaluación de la residualidad de los fungidas tanto por HPLC-PDA como para UHPLC-MS dieron como resultado que el posible enlatado de las variedades de arveja estudiadas y producidas

en Nariño, cumplirían con los LMR permitidos por el *codex alimentarius* teniendo un valor igual o inferior a 0.01 mg/L, también se confirma la ausencia de productos de transformación del Carbendazim siendo este el único analito presente en las corridas cromatográficas dando de esta manera la viabilidad comercial del enlatado de arveja de las dos variedades de la ex provincia de Obando.

CONCLUSIONES

Los resultados de la validación muestran que la idoneidad del sistema cromatográfico es adecuada, los picos de los fungicidas MBC y BEH se lograron identificar en las muestras por medio de los t_R y espectros de absorción similares a los estándares de referencia, y no se observaron interferencias significativas que afectaran la selectividad, lo que permite una identificación y cuantificación apropiada de los analitos, respecto a la transformación de los fungicidas, se confirmó una hidrólisis efectiva de BEH a MBC para llevar a cabo los análisis.

Se obtuvo una linealidad del método dentro del rango de 0.01 a 5 mg/L para el MBC total con un R^2 de 0.9999 concordando con el modelo lineal propuesto; La precisión alcanzó %RSD menores a 6% determinando que el método es repetible y reproducible, como también es exacto debido a que se encontró un % de recuperación = 97.63 en promedio, lo que permite la cuantificación apropiada de los fungicidas.

La extracción a partir de la técnica QuEChERS mostró ser eficiente debido a que consume menor tiempo y otorga excelentes porcentajes de recuperación, obteniéndose extractos limpios y aptos para ser analizados en el HPLC- PDA; Los extractos de las arvejas del T_0 y T_1 mostraron una residualidad de MBC total superior a los LMR establecidos por el *codex alimentarius* para ambas variedades, observándose un decrecimiento en las concentraciones de residuos a medida que se avanzó en el proceso de conservación, finalmente los extractos del T_2 correspondientes al producto final (enlatado) de arveja no presentaron residuos superiores al 0.01 mg/L permitido para el consumo del ser humano; Cabe destacar que entre las dos variedades la que presentó menor bioacumulación en el grano fue la Alcalá, observándose también que la vaina correspondiente a esta variedad presentó mayor contenido del pesticida.

Según los resultados obtenidos en UHPLC-MS se confirmó la ausencia de residuos de BEH y el producto de transformación de MBC (2-AB) mediante los análisis cromatográficos donde la única señal obtenida fue de Carbendazim a los 16.03 min, las señales obtenidas en los espectros de masas correspondientes al escaldado y enlatado no mostraron como resultado al ión producto del (2-AB) con $m/z = 134$ descartando completamente su formación en proceso de

conservación de la arveja, por otra parte se confirmó que las señales fueron correspondientes a las típicas fragmentaciones del Carbendazim reportadas en la literatura con los producto $m/z=192$ y 160 , las cantidades de Carbendazim que arrojó la curva de calibración para el enlatado de arveja (0.01 mg/L) se encuentra de acuerdo con los límites establecidos por el *codex alimentarius*, lo que convierte al enlatado en una herramienta importante que además de alargar el tiempo de vida protege la calidad de sus productos y garantiza la seguridad alimentaria de los consumidores asegurando la ausencia de estos fungicidas en el producto final.

RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir la metodología planteada sin realizarle modificaciones, en caso de haber cambios en el sistema cromatográfico fuera del rango propuesto o en el tipo de matriz la validación deberá ser revisada y estandarizada bajo las nuevas condiciones.

Según los resultados obtenidos para la residualidad en vainas de arveja, se recomienda realizar el presente estudio en tipos de legumbres donde la vaina se consume por ejemplo las habichuelas, pues el alto contenido de fungicidas encontrados representa un peligro para el consumo humano según el *codex alimentarius*.

Continuar con el estudio de diferentes fungicidas como mancozeb y tiabendazol que son también bastante recurrentes en las fincas agrícolas nariñenses en matrices vegetales que puedan estar sujetas a bioacumulación, así como también evaluar la importancia de vainas resistentes que protejan de la contaminación a los granos de las legumbres.

Implementar un programa de monitoreo y capacitaciones en las fincas agrícolas de la ex provincia de Obando con el fin de minimizar las cantidades de fungicidas utilizados a lo largo del cultivo de arvejas para mejorar la calidad de la cosecha y así mismo el producto que llega a los hogares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A.E.F.I. (2001). Guía de Validación de Métodos Analíticos. In R. Suarez (Ed.), *Barcelona* (1st ed.). España.
- Abdelraheem, E. M. H., Hassan, S. M., Arief, M. M. H., & Mohammad, S. G. (2015). Validation of quantitative method for azoxystrobin residues in green beans and peas. *Food Chemistry*, *182*, 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.106>
- Agüera, A., & de Kok, A. (2005). Chapter 7 GC-MS. II: Applications for pesticide analysis in food. *Comprehensive Analytical Chemistry*, *43*(1), 339–368. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(05\)80027-3](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(05)80027-3)
- Ahmed, F. E. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *20*(11), 649–661. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00121-2)
- Ahumada, D. A., & Zamudio, A. M. (2011). Analysis of pesticide residues in tomato using quechers sample preparation and ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Revista Colombiana de Química*, *40*(2), 227–246.
- Alder, L. & Hill, A. (1988). Guidelines for predicting the dietary intake of pesticide residues. *Bulletin of the World Health Organization*, *3*(1), 179–252.
- Alvarado, J., Martínez, G., Navarrete, J., Botello, E., Calderón, M., & Jiménez, H. (2009). Fenomenología de la esterilización de alimentos líquidos enlatados. *Revista Facultad de Ingeniería*, *50*(1), 87–98.
- Álvarez, V. H. (2011). Protocolo de vigilancia y control de intoxicaciones por plaguicidas. Retrieved September 2, 2017, from Instituto Nacional de Salud website: WWW.minsalud.gov.co/intoxicacion_por_plaguicidas
- Ambrus, A. & Fajgeli, A. (2000). Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals. *Royal Society of Chemistry*, *108*(1), 24–36. <https://doi.org/10.1039/9781847551757-00179>
- AOAC. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. In AOAC INTERNACIONAL (Ed.), *Journal of AOAC International* (20th ed.). USA.
- AOAC. (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In AOAC INTERNACIONAL (Ed.), *AOAC Official Methods of Analysis* (20th ed., p. 9). USA.

- Araujo, J.J., Dangond, A., & Dallos, J. (2008). Metodología Para La Determinación De Residuos De Fungicidas Benzimidazólicos En Fresa Y Lechuga Por Hplc-Dad. *Revista Colombiana de Química*, 35(1), 67–79.
- Awuah, G. B., Ramaswamy, H. S., & Economides, A. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6), 584–606. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.08.004>
- Balsa-Canto, E., Rodriguez-Fernandez, M., & Banga, J. R. (2007). Optimal design of dynamic experiments for improved estimation of kinetic parameters of thermal degradation. *Journal of Food Engineering*, 82(2), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.006>
- Berrada, H., Font, G., Monto, J. C. (2003). *Revista de Toxicología*. 2(2016), 83–142.
- Bojacá, C. R., Arias, L. A., Ahumada, D. A., Casilimas, H. A., & Schrevens, E. (2013). Evaluation of pesticide residues in open field and greenhouse tomatoes from Colombia. *Food Control*, 30(2), 400–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.015>
- Campoy, C., Jiménez, M., Olea-Serrano, M. F., Moreno Frias, M., Cañabate, F., Olea, N., ... Molina-Font, J. A. (2001). Analysis of organochlorine pesticides in human milk: Preliminary results. *Early Human Development*, 65(1), 90–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(01\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(01)00221-3)
- Carmona, M., & Sautua, F. (2017). In vitro sensitivity assessment of late season soybean pathogens to fungicide mixtures. *Australasian Plant Dis.*, 12(20), 1–4. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0244-7>
- Chiba, M.; Cherniak, E. (1978). Kinetic Study of Reversible conversion of Methyl 1-(Butylcarbamoil)-2-benzimidazolecarbamate (benomyl) to Methyl 2-benzimidazolecarbamate (MBC) and n-Butyl Isocyanate (BIC) in organic Solvents. *J. Agric. Food Chem*, 06(23), 573–576.
- Codex alimentarius. (2013). Norma General para los aditivos alimentarios. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Danaher, M., De Ruyck, H., Crooks, S. R. H., Dowling, G., & O’Keeffe, M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 845(1), 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.046>
- DANE. (2019). 5. Departamento administrativo Nacional de Estadística. Retrieved September 2,

- 2017, from Marzo website: www.dane.gov.co
- del Puerto Rodríguez, A. ., Suárez, S. ., & Palacio, E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiologia*, 52(3), 372–387.
- Enriquez, P. (1999). *Evaluación de Riesgos para la Gestión de Plaguicidas* (Ministerio de salud). Retrieved from <http://www.minsa.gob.pe/oge>
- Estrada. C. (2018). *Desarrollo y validación de la técnica analítica para cuantificación de clotrimazol y clindamicina en cápsula blanda*. universidad de Nariño.
- FAO. (2012). Pesticide residues in food. Retrieved October 2, 2017, from FAO Plant, Production and Protection Paper website: www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm
- Fedearroz. (2015). Ficha técnica de Carbendazim. Retrieved August 16, 2017, from www.fedearroz.com.co/agroquimicos/carbedazim
- Garrote, R. L., Silva, E. R., & Roa, R. D. (2009). Diffusion and thermal degradation of ascorbic acid during canned fresh green peas sterilisation. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(10), 1990–1995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02018.x>
- Gaviria López, B. Y., & Mazuera García, P. A. (2010). Evaluación del tratamiento térmico de las arvejas enlatadas (*pisum sativum*) en salmuera. *Publicaciones e Investigación*, 4, 129–143. <https://doi.org/10.22490/25394088.582>
- Gobernación de Nariño. (2016). Plan de Desarrollo Departamental. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gomes da Cruz, A., Cenci, S. A., & Antun Maia, M. C. (2006). Good agricultural practices in a Brazilian produce plant. *Food Control*, 17(10), 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.05.002>
- Grimalt, S. (2009). *Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triplecuadrupolo y tiempo de vuelo en el analisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal*. Universidad de jaume.
- Helen., C. (2000). Tecnologia de alimentos, procesos fisicos y químicos en la preparación de alimentos. In G. Noriega (Ed.), *Journal of Chemical Information and Modeling* (1st ed., Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Hershberger, L. (1993). Criterios de salud ambiental 148 Benomyl. In W. H. Organization (Ed.), *IPCS-INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY* (2nd ed., p. 148). Geneva.

- Ibarz, R., Garvín, A., Pagán, J., & Ibarz, A. (2015). Kinetic modeling of photochemical degradation of benomyl. *Afinidad*, 72, 108–113.
- ICA. (2016). Subgerencia Protección y Regulación Agrícola restricciones, prohibiciones y Suspensión de Registros de plaguicidas de uso agrícola en Colombia. Retrieved September 15, 2004, from Instituto Colombiano Agropecuario website: www.ica.gov.co
- ICH. (2005). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.162004>
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2016). Ficha técnica de Benomil. Retrieved from Documentación Límites Exposición Profesional website: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/Ficheros/DLEP10.pdf
- Kling, M., & Jakobsen, I. (1997). Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi species: Effect on ³²P transport and succinate dehydrogenase activity. *Mycorrhiza*, 7, 33–37. <https://doi.org/10.1007/s005720050160>
- López, F. A., García, M. E., & Fernández, S. I. (2010). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. Universidad politécnica de Valencia.
- Lozada Castro, J. J. (2012). *Determinación de óxidos de colesterol en muestras de alimentos mediante cromatografía de gases*. universidad complutense de madrid.
- Márquez Delgado, L. (2008). La evolución del equipo mecánico para la aplicación de fitosanitarios en los últimos veinte años. *Phytoma España: La Revista Profesional de Sanidad Vegetal*, 196(1), 32–36.
- Medina, G. J., & Trujillo, A. (2002). Norma de procedimientos para el muestreo de productos vegetales. Retrieved September 20, 2017, from www.fao.org/forestry/12947-09a8259bc751929ba7c7eb6c455126594.pdf
- Mejía., D. (2012). *Evaluación de la sensibilidad del complejo Ascochyta en arveja (Pisum sativum) al jugo de fique (Furcraea gigantea) pasteurizado*. Universidad de Nariño.
- Michel, M., & Buszewski, B. (2004). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 800(1–2), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.08.039>

- Molina, I. A. (2012). *Metodología para la determinación de plaguicidas bencimidazoles en vinos*. universidad Nacional de Cuyo.
- Moltó Cortés, J. C., & Berrada, H. (2004). Critical reviews in analytical chemistry. In CRC Press (Ed.), *Handbook of Food Analysis Second Edition: Residues and Other Food Component Analysis* (2nd ed., pp. 19–33). <https://doi.org/10.1201/b18668-46>
- Nantia, E. A., Moreno, D., Manfo, F. P. T., Gámiz, L., & Campaña, A. M. (2017). QuEChERS-based method for the determination of carbamate residues in aromatic herbs by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 216(1), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.038>
- Orozco, F. & Torres, L. (2011). El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), su relación con el medio ambiente y la salud. Universidad tecnica de Ambato.
- Pacheco, C & Vergara, M. (2010). Clasificación de 42 líneas mejoradas de arveja (*pisum sativum* L.) Por caracteres morfológicos y comportamiento agronómico. universidad de antioquia.
- Peralta, E., Murillo, A., Mazon, N., Monar, C., & Rivera, M. (2010). Manual agrícola de fréjol y otras leguminosas. In E. I. Quito (Ed.), *INIAP* (2nd ed., p. 79). quito.
- Phytocontrol. (2018). metabolitos agrícolas. Retrieved July 7, 2017, from www.phytocontrol.com/es/metabolito
- Ponce Robles, L. (2012). *Determinacion de pesticidas de carácter ácido en frutas y hortalizas mediante LC-MS/MS*. universidad de Almería.
- Pozo., A. (2013). Estudio de residuos de carboburán y metamidofos en papa (*Solanum tuberosum*) consumida en la sierra ecuatoriana. universidad central del ecuador.
- PPDB. (2014). Pesticide properties database. Retrieved August 16, 2017, from sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/
- Quattrocchi & Abelaira, L. (1992). *Introducción a la HPLC aplicación y práctica*.
- Ramírez Milla, L. G. (2009). *Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS)*. universidad tecnologica de Mixteca.
- Señorans, F. J., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2003). La preparación de la muestra, Asignatura de Análisis Instrumental y Sensorial de Alimentos. <https://doi.org/10.1080/10408690390246341>
- Silvia B Visciglio. (2010). *Desarrollo de metodologías Alternativas para el análisis de Fungicidas benzimidazólicos en Matrices cítricas*. universidad politecnica de Valencia.
- SIVIGILA. (2013). Caracterización epidemiológica de las intoxicaciones por plaguicidas en Colombia. *Iqen*, 18(20), 222–241. Retrieved from

[http://www.ins.gov.co:81/iqen/IQUEN/IQEN vol 18 2013 num 21.pdf](http://www.ins.gov.co:81/iqen/IQUEN/IQEN%20vol%2018%202013%20num%2021.pdf)

- Skoog, D. a., West, D. M., Holler, F. J., & Couch, S. R. (2005). Fundamentos de Química Analítica. *Fundamentos de Química Analítica*, 480–560. <https://doi.org/10.1016/S0584-8547>
- Tecnoagricola. (2015). Fungicidas penetrantes y sistematicos. Retrieved June 13, 2017, from [www.tecnoagricola.es/fungicidas-penetrantes y sistematicos](http://www.tecnoagricola.es/fungicidas-penetrantes-y-sistematicos)
- UPNA, H. (2009). Flora pratense y forrajera cultivada en la península Ibérica. Retrieved February 17, 2017, from Boletín la AHIM website: www.unavarra.es/servicio/herbario/pratenses/htm/Pisu_sati_p.htm %0A
- Vaca, I., & Landázuri, P. (2011). Evaluación de tres niveles de nitrógeno en medio cultivo, en las fases de enraizamiento in vitro y adaptación a sustrato de *Rubus glaucus* (BENTH) (universidad técnica del norte). <https://doi.org/10.17163/lgr.n18.2013.04>
- Valencia, A., Timaná, Y., & Checa, O. (2010). Evaluación de 20 líneas de arveja (*Pisum sativum* L.) y su reacción al complejo de *Ascochyta*. universidad de Nariño.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., & Ferreres, F. (2004). Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.045>
- Wani, A. A., Dar, A. A., Jan, I., Sofi, K. A., Sofi, J. A., & Dar, I. H. (2019). Dissipation, risk assessment, half-life period and method validation of carbendazim and triazophos in green pea by high-performance liquid chromatography. *SEPARATION SCIENCE PLUS*, 2, 284–290. <https://doi.org/10.1002/sscp.201800143>

ANEXOS

Anexo A selectividad.

A.1 Hidrolisis acida

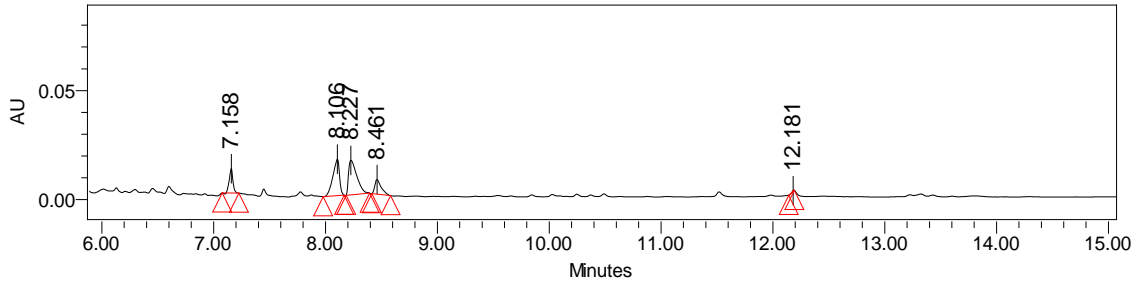


Figura 1. Cromatograma amplificado de Hidrolisis ácida MBC fuente: esta investigación.

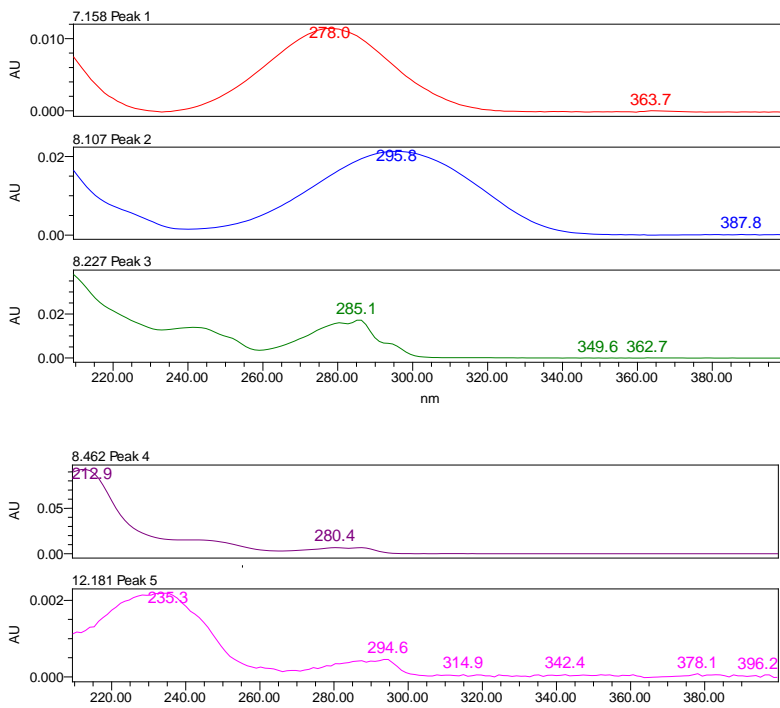


Figura 2. Identificación por UV fuente: esta investigación.

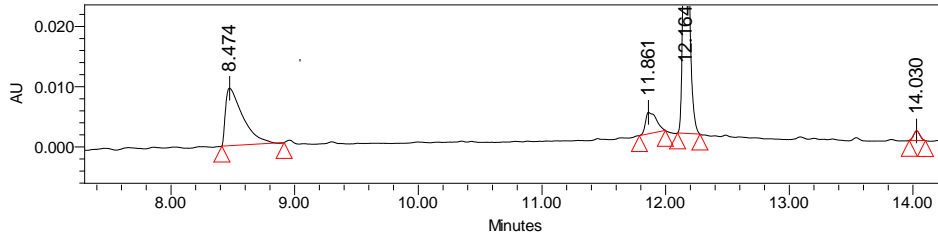


Figura 3. Cromatograma individual amplificado de Hidrolisis acida de BEH fuente: esta investigación.

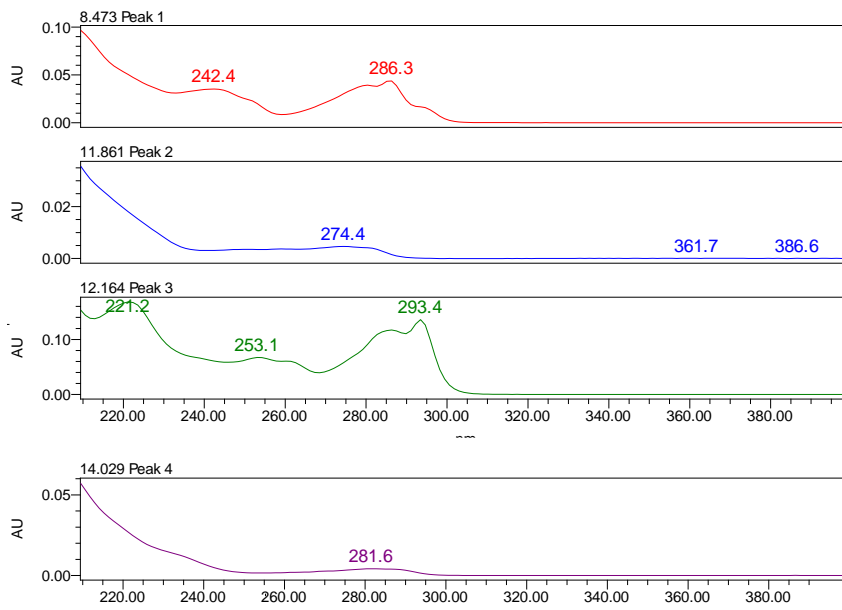


Figura 4. Identificación por UV fuente: esta investigación.

A.3 Evaluación de excipientes

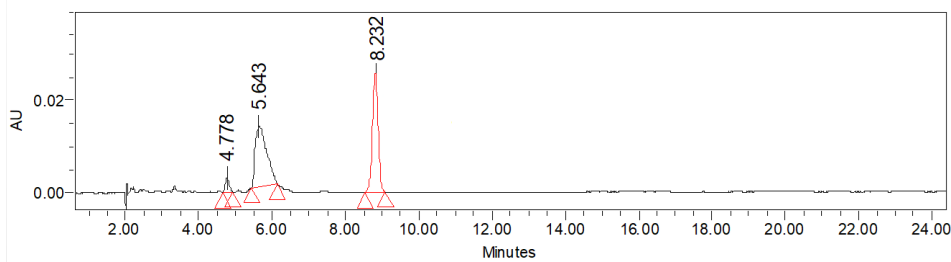


Figura 5. Cromatograma de señales de los excipientes en producto comercial de MBC. Detección a 285 nm. Fuente: esta investigación.

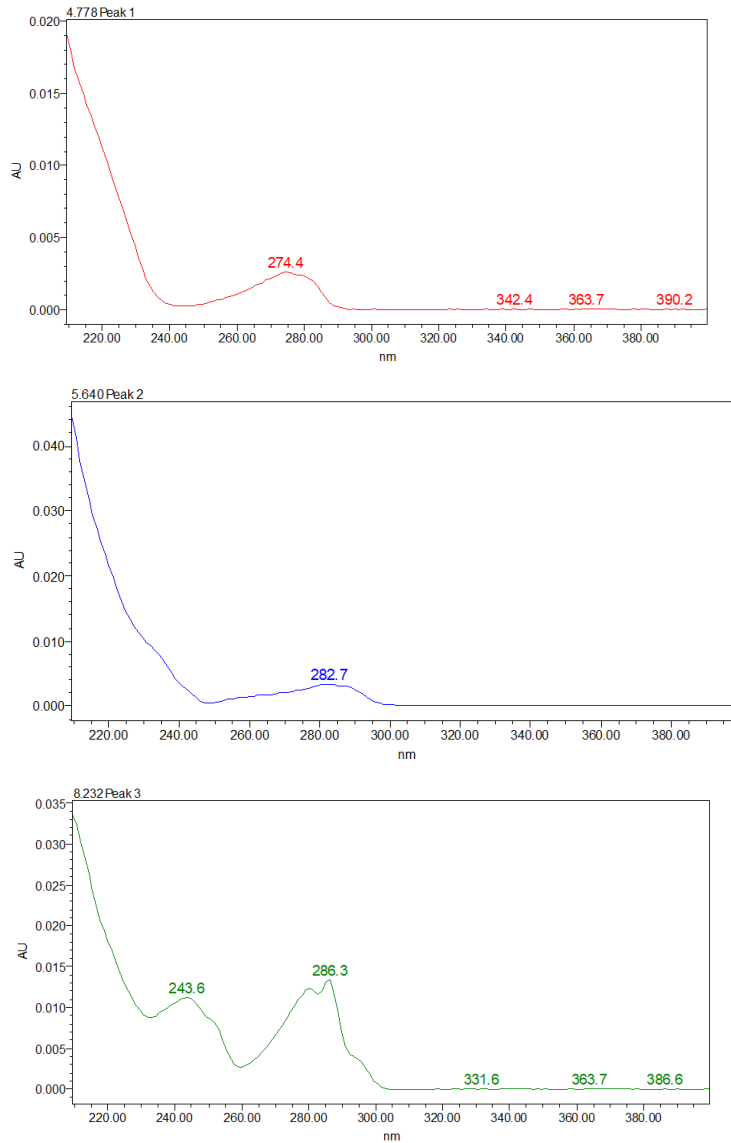


Figura 6. Identificación por UV de excipientes Fuente: esta investigación.

A.4 Evaluación del efecto matriz

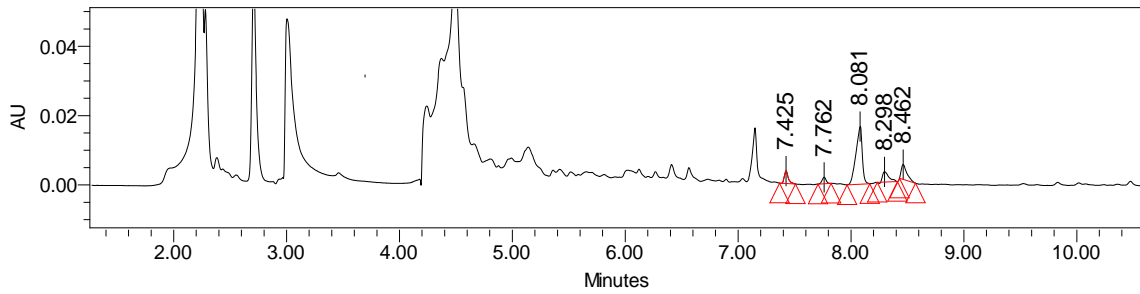


Figura 7. Cromatograma amplificado de la figura 27. Fuente: esta investigación.

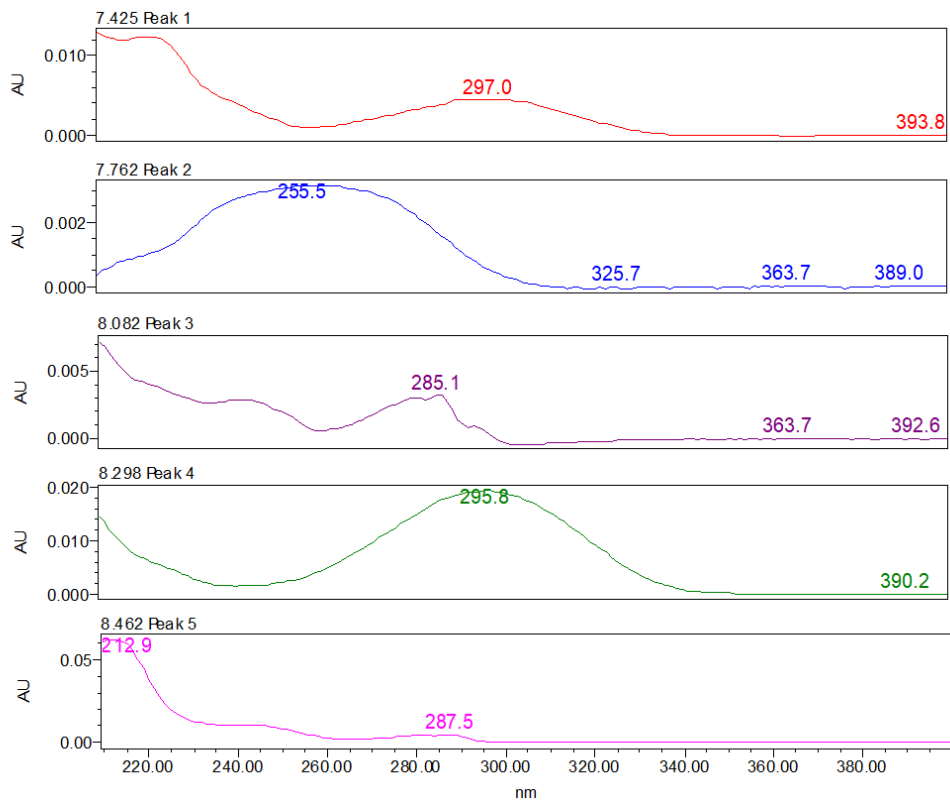


Figura 8. Identificación por UV interferencias de matriz cercanas al tiempo de retención del MBC.

Fuente: esta investigación.

Anexo B. Productos comerciales de BEH y MBC

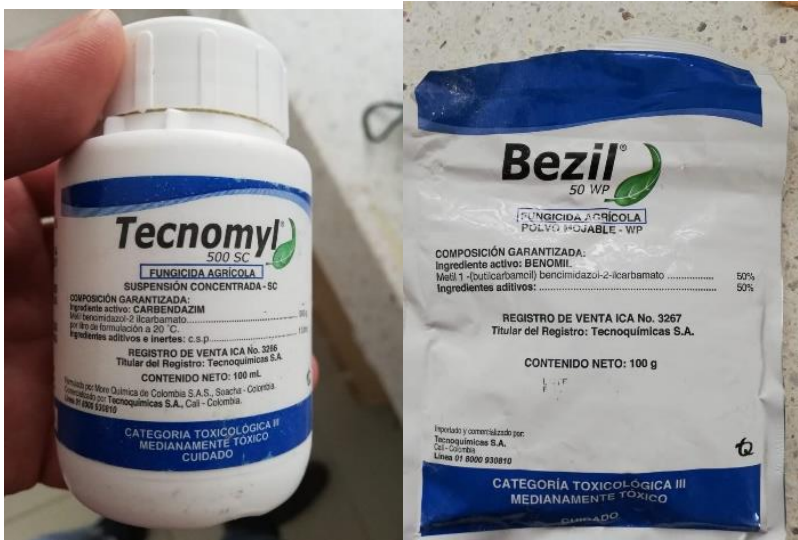


Figura 9. Producto comerciales de BEH Y MBC de marca Tecnomyl y Bezil. Fuente: esta investigación.

RECOMENDACIONES:

CULTIVO	ENFERMEDAD	DOSIS	FRECUENCIA DE APLICACIÓN	PERÍODO DE CARENCIA*
ARROZ	Piricularia (Pyricularia grisea)	250 - 500 g/Ha	1 - 2 aplicaciones / ciclo de cultivo	21 días
FRESAS	Pudrición de la fruta (Botrytis sp.)	135 - 150 g/ 100 litros de agua	1 - 2 aplicaciones / ciclo de cultivo	21 días
FRIJOL	Antracnosis (Colletotrichum lindemuthianum)	250 - 500 g/Ha ó 25 - 50 g/ 100 litros de agua	1 - 2 aplicaciones / ciclo de cultivo	7 días
CLAVEL	Moho gris (Botrytis sp.)	0.6 g/litro de agua	Aplicaciones preventivas / ciclo de cultivo	No hay

Figura 10. Especificaciones de los productos comerciales. Fuente: esta investigación.

Anexo C.1 Regresión simple, ANOVA y T-student para linealidad del sistema

Tabla 1. ANOVA sistema Fuente: esta investigación.

	x	y	x.y	x ²	y ²	FR (y/x)
	0,01	1615	16,15	0,0001	2608225	161500
	0,01	1642	16,42	0,0001	2696164	164200
	0,05	7547	377,35	0,0025	56957209	150940
	0,05	7689	384,45	0,0025	59120721	153780
	0,1	20327	2032,7	0,01	413186929	203270
	0,1	19801	1980,1	0,01	392079601	198010
	0,5	80192	40096	0,25	6430756864	160384
	0,5	80200	40100	0,25	6432040000	160400
	1	160779	160779	1	2,585E+10	160779
	1	160162	160162	1	2,5652E+10	160162
	5	800050	4000250	25	6,4008E+11	160010
	5	785378	3926890	25	6,1682E+11	157075,6
SUMATORIA	13,32	2125382	8333084,17	52,5252	1,3222E+12	1990510,6
MEDIA	1,11	177115,167	694423,681	4,3771	1,1018E+11	165875,883

Regresión Simple - Area vs. Concentración

Variable dependiente: Area

Variable independiente: Concentración

Lineal: $Y = a + b \cdot X$

Tabla 2. **Coefficientes** Fuente: esta investigación.

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	1411,93	1251,15	1,1285	0,2855
Pendiente	158291,	598,021	264,692	0,0000

Tabla 3. Análisis de Varianza Fuente: esta investigación.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	9,45617E11	1	9,45617E11	70061,71	0,0000
Residuo	1,34969E8	10	1,34969E7		
Total (Corr.)	9,45752E11	11			

Coefficiente de Correlación = 0,999929

R-cuadrada = 99,9857 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9843 por ciento

Error estándar del est. = 3673,82

Error absoluto medio = 2393,78

Estadístico Durbin-Watson = 2,18015 (P=0,5117)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,304951

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre Area y Concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Area} = 1411,93 + 158291 * \text{Concentración}$$

Tabla 4. Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste Fuente: esta investigación.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	9,45617E11	1	9,45617E11	70061,71	0,0000
Residuo	1,34969E8	10	1,34969E7		
Carencia de Ajuste	2,69963E7	4	6,74907E6		
Error Puro	1,07973E8	6	1,79955E7		
Total (Corr.)	9,45752E11	11			

Anexo C.2 Regresión simple, ANOVA y T-student para linealidad del método

Tabla 5. ANOVA método Fuente: esta investigación.

	x	y	x.y	x ²	y ²	FR(y/x)
	0,01	1621	16,21	0,0001	2627641	162100
	0,01	1625	16,25	0,0001	2640625	162500
	0,01	1569	15,69	0,0001	2461761	156900
	0,05	7469	373,45	0,0025	55785961	149380
	0,05	7455	372,75	0,0025	55577025	149100
	0,05	7580	379	0,0025	57456400	151600
	0,1	19269	1926,9	0,01	371294361	192690
	0,1	19803	1980,3	0,01	392158809	198030
	0,1	19667	1966,7	0,01	386790889	196670
	0,5	77618	38809	0,25	6024553924	155236
	0,5	78101	39050,5	0,25	6099766201	156202
	0,5	77099	38549,5	0,25	5944255801	154198
	1	156302	156302	1	2,443E+10	156302
	1	159822	159822	1	2,5543E+10	159822
	1	158281	158281	1	2,5053E+10	158281
	5	789336	3946680	25	6,2305E+11	157867,2
	5	787262	3936310	25	6,1978E+11	157452,4
	5	768920	3844600	25	5,9124E+11	153784
SUMATORIA	19,98	3138799	12325451,3	78,7878	1,9285E+12	2928114,6
MEDIA	1,11	174377,722	684747,292	4,3771	1,0714E+11	162673,033

Tabla 6. Coeficientes Fuente: esta investigación.

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	1017,24	1209,96	0,840726	0,4129
Pendiente	156181,	578,332	270,053	0,0000

Tabla 7. Análisis de Varianza Fuente: esta investigación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,38085E12	1	1,38085E12	72928,81	0,0000
Residuo	3,02948E8	16	1,89343E7		
Total (Corr.)	1,38116E12	17			

Coefficiente de Correlación = 0,99989

R-cuadrada = 99,9781 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,9767 por ciento

Error estándar del est. = 4351,35

Error absoluto medio = 2810,86

Estadístico Durbin-Watson = 1,81908 (P=0,2618)

Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,00198864

El StatAdvisor

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre áreas y concentración. La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Área} = 1017,24 + 156181 * \text{concentración}$$

Tabla 8. Análisis de Varianza con Carencia de Ajuste. Fuente: esta investigación

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	1,38085E12	1	1,38085E12	72928,81	0,0000
Residuo	3,02948E8	16	1,89343E7		
Carencia de Ajuste	4,35389E7	4	1,08847E7		
Error Puro	2,59409E8	12	2,16174E7		
Total (Corr.)	1,38116E12	17			

Anexo D. Prueba G de Cochran para linealidad del sistema

Tabla 9. Rueba de Cochran. Fuente: esta investigación

% teórico	Factor de respuesta	X	S	S ²
0,01	161500	162850	1909,188309	3645000
0,01	164200			
0,05	150940	152360	2008,183259	4032800
0,05	153780			
0,1	203270	200640	3719,381669	13833800
0,1	198010			
0,5	160384	160392	11,3137085	128
0,5	160400			
1	160779	160470,5	436,284884	190344,5
1	160162			
5	160010	158542,8	2074,934139	4305351,68
5	157075,6			
			Σ	26007424,2

$$G_{\text{exp}} 0,531917344 < G_{\text{tab}}=0,780$$

Anexo E. %RSD áreas y tr para linealidad

Tabla 10. Linealidad Fuente: esta investigación

% RSD áreas						%RSD tr
CONCENTRACION	AREAS	X	S	%RSD		
0,01	1615	1628,5	19,0918831	1,17236003		8,208
	1642					8,37
0,05	7547	7618	100,409163	1,3180515		8,433
	7689					8,383
0,1	20327	20064	371,938167	1,85375881		8,388
	19801					8,381
0,5	80192	80196	5,65685425	0,00705379		8,378
	80200					8,363
1	160779	160470,5	436,284884	0,27187856		8,333
	160162					8,356
5	800050	792714	10374,6707	1,30875331		8,355
	785378					8,233
					X	8,34841667
					S	0,06460292
					%RSD	0,77383446

Anexo F. Prueba F de Fisher y ANOVA para precisión intermedia del método

Tabla 11. ANOVA PRECISIÓN PARA AREA Fuente: esta investigación

Análisis de Varianza para AREAS - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:ANALISTA	2,94339E9	1	2,94339E9	2,78	0,1298
B:DIA	3,20447E9	1	3,20447E9	3,03	0,1159
RESIDUOS	9,52958E9	9	1,05884E9		
TOTAL (CORREGIDO)	1,56774E10	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla 12. Medias por Mínimos Cuadrados para AREAS con intervalos de confianza del 95,0%.

Fuente: esta investigación

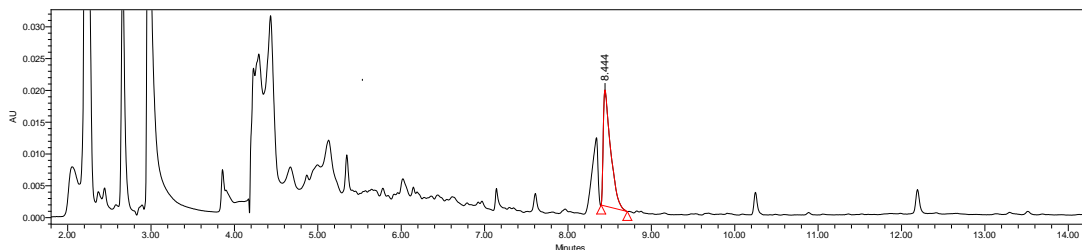
			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	12	679790			
ANALISTA					
1	6	695452	13284,3	665400,	725503,
2	6	664129	13284,3	634077,	694180,
DIA					
1	6	696131,	13284,3	666080,	726183,
2	6	663449,	13284,3	633397,	693500,

Tabla 13. Precisión intradía Fuente: esta investigación

PRECISIÓN INTRA DIA AREAS				
	Día 1 ana	Día 1 ana	Día 2 ana	Día 2 ana
	1	2	1	2
	713844	684723	642442	672478
	762781	684358	663829	636176
	707692	623390	682121	683646
S	30186,8487	35305,7293	19859,6076	24819,2141
x	728105,667	664157	662797,333	664100
%RSD	4,14594338	5,31587099	2,99633184	3,73727061
SX	32216,5649	PRECISIÓN INTERDÍA		
XX	679790			
%RSD	4,7391937			

Anexo G. efectos de pH y temperatura en los fungicidas

G.1 Efecto de pH



Name	Retention Time	Area	% Area	Height
	8.444	159225	100.00	18352
Name	Retention Time	Area	% Area	Height
	8.355	158572	100.00	18280

Figura 11. **MBC a pH 3** Fuente: esta investigación

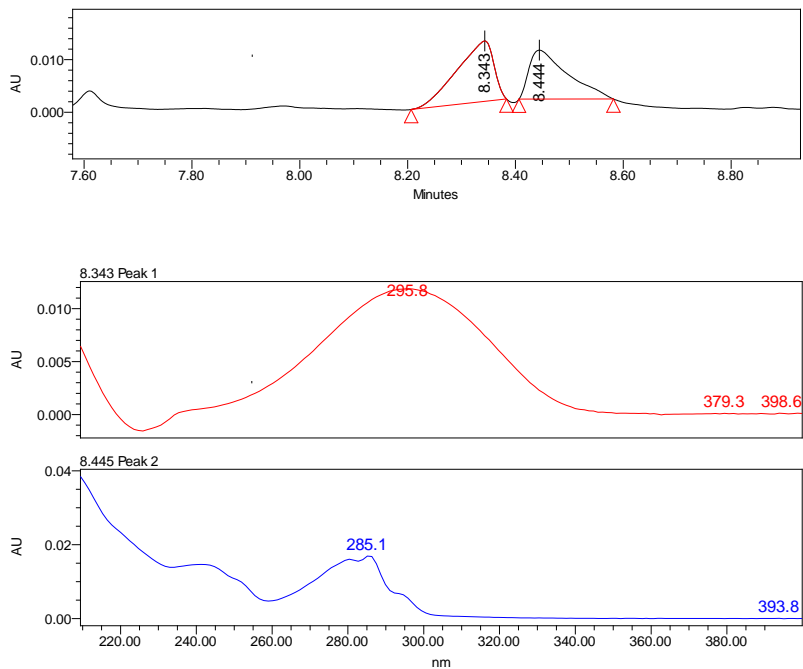


Figura 12. Identificación por UV Fuente: esta investigación

No hay presencia de BEH

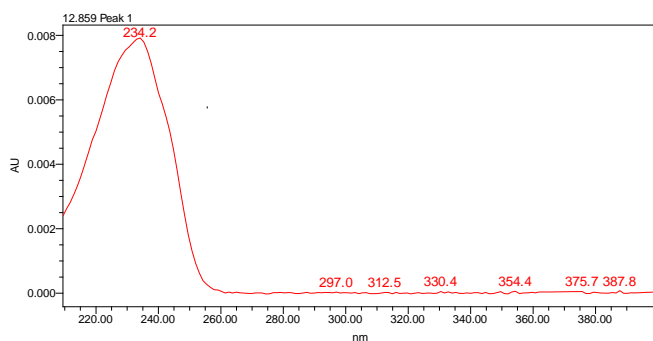
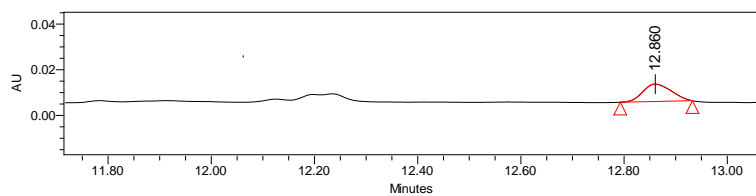
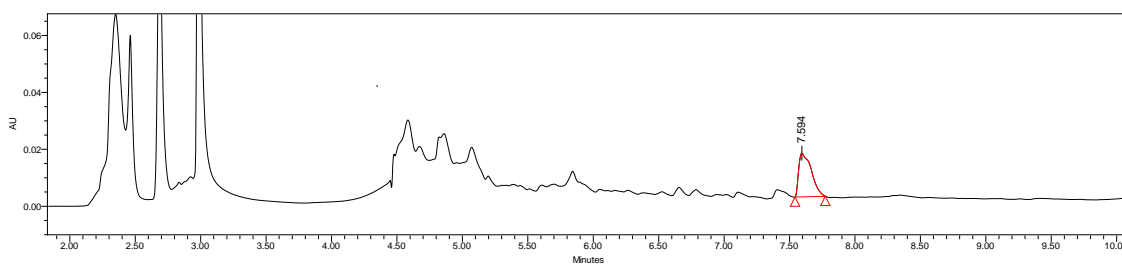


Figura 13. Identificación por UV Fuente: esta investigación



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.594	156688	100.00	14792
	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.609	158007	100.00	14792

Figura 14. MBC a pH 6 Fuente: esta investigación

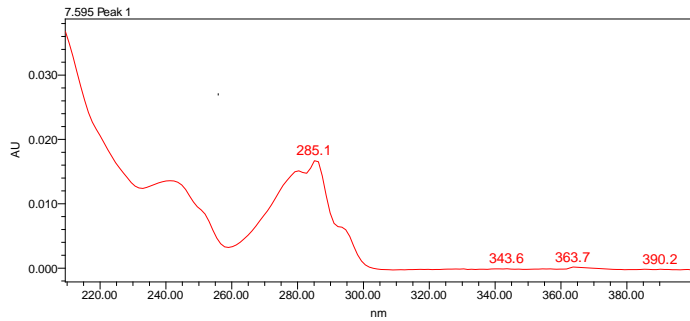
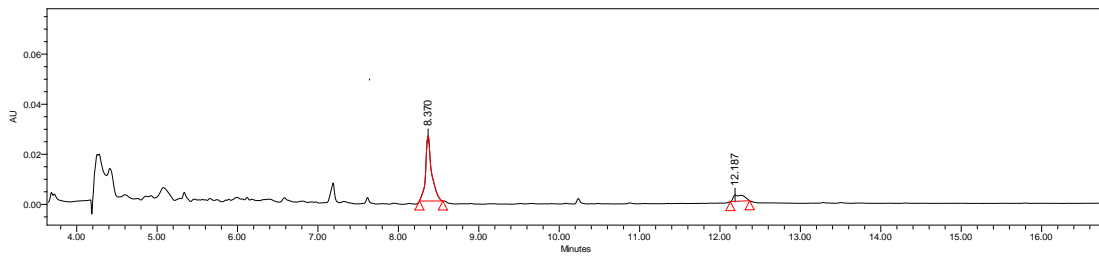


Figura 15. Identificación por UV Fuente: esta investigación

G.2 efecto de la temperatura



Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	8.370	136380	85.33	26013
2	12.187	23445	14.67	2578

Figura 16. Temperatura 0°C (sin tratamiento térmico) Fuente: esta investigación

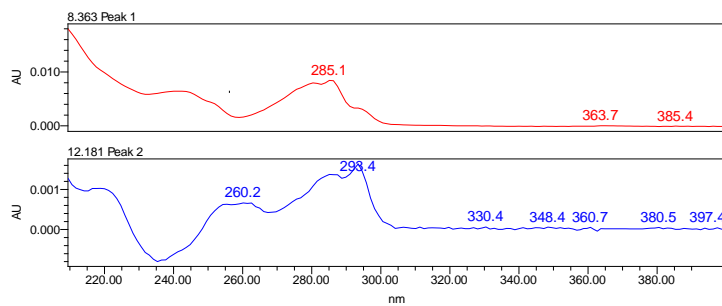
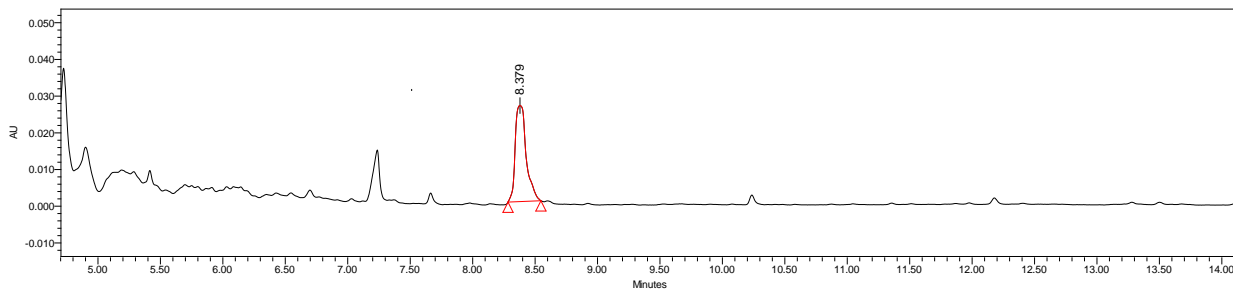


Figura 17. Identificación por UV Fuente: esta investigación



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		8.379	159848	100.00	26148

Figura 18. Temperatura 90°C (tratamiento térmico) Fuente: esta investigación

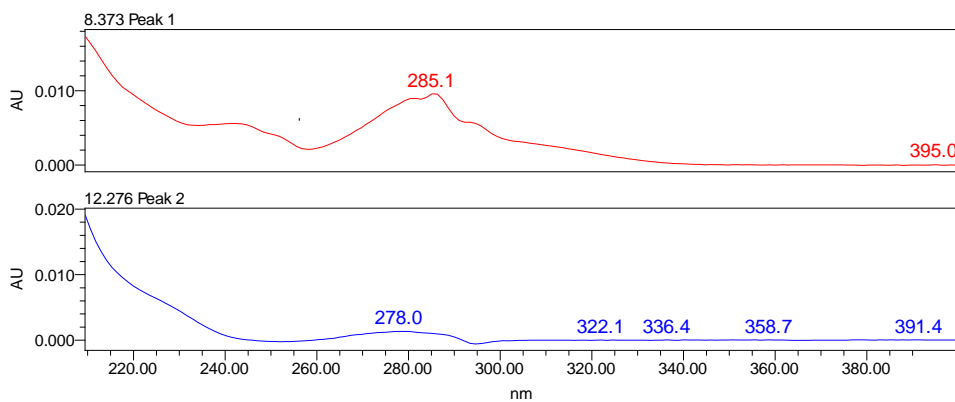
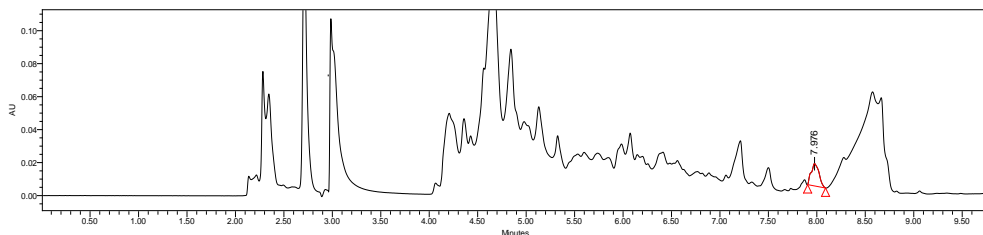


Figura 19. Identificación por UV Fuente: esta investigación

Anexo H. Cuantificación de pesticidas en muestras

MUESTRAS



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.976	76037	100.00	13542

(REPLICA)

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.980	68291	100.00	7352

Figura 20. Tratamiento (T₀) variedad Alcalá Fuente: esta investigación

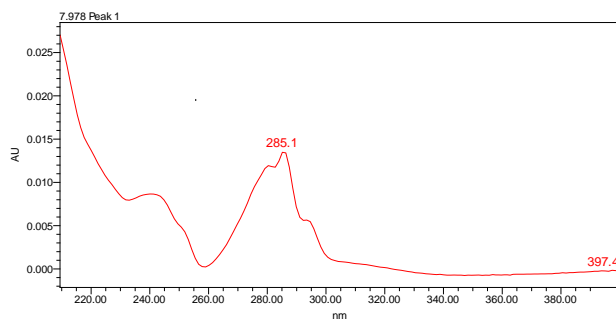


Figura 21. Identificación por UV Fuente: esta investigación

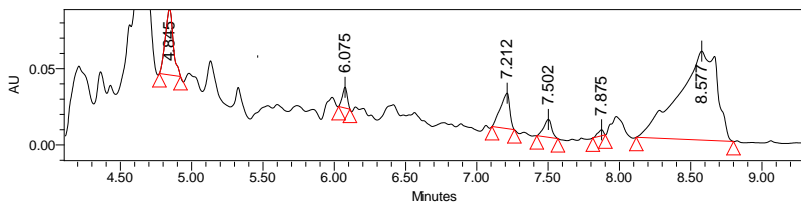


Figura 22. Señales cercanos al analito de interés Fuente: esta investigación

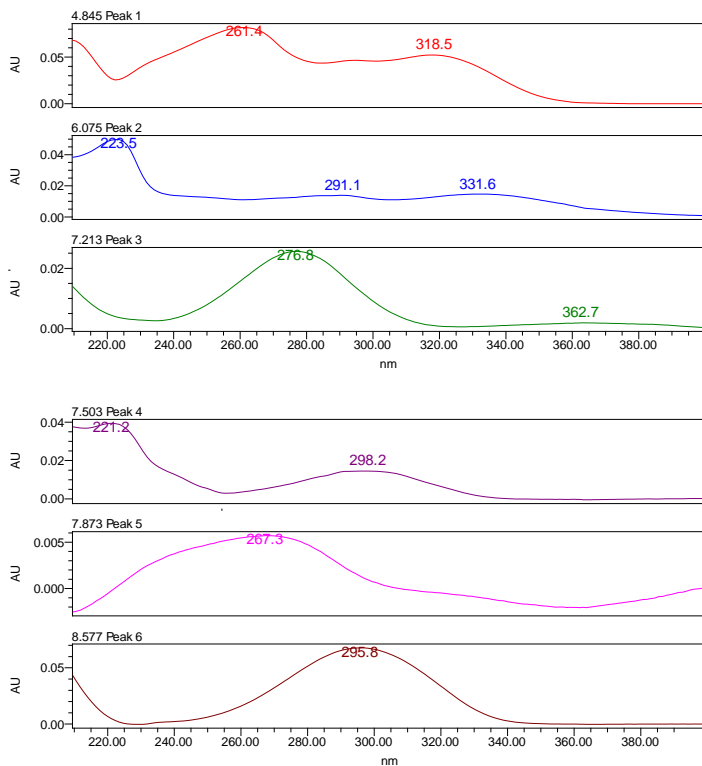


Figura 23. Identificación por UV Fuente: esta investigación

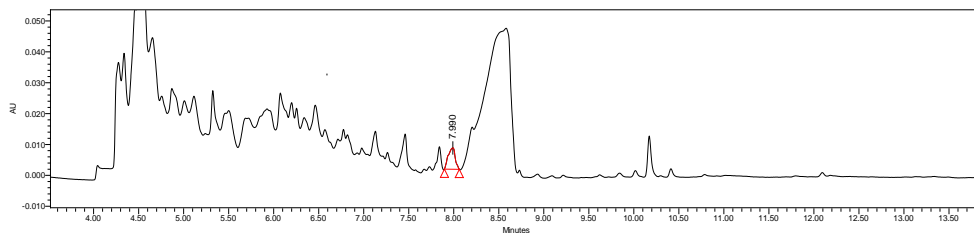
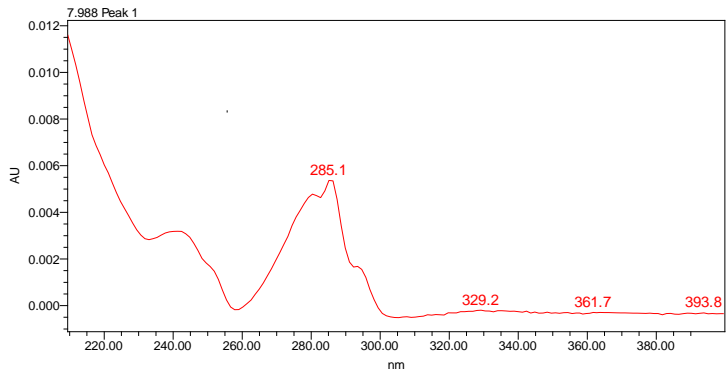


Figura 24. Tratamiento (T_1) variedad de Alcalá Fuente: esta investigación



Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	7.990	37060	100.00	6909

(REPLICA)

Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	7.992	30366	100.00	7475

Figura 25. Identificación por UV Fuente: esta investigación

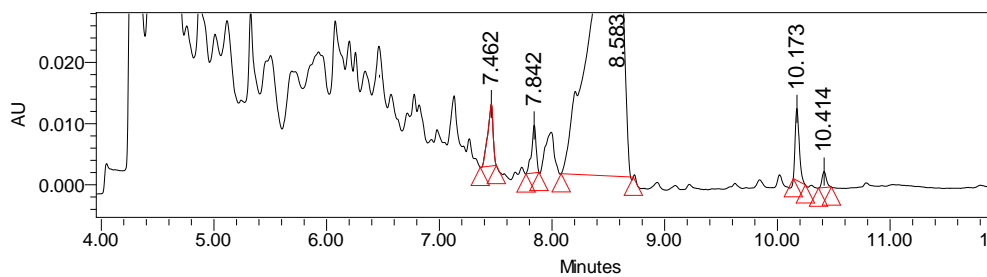


Figura 26. Señales cercanos al MBC Fuente: esta investigación

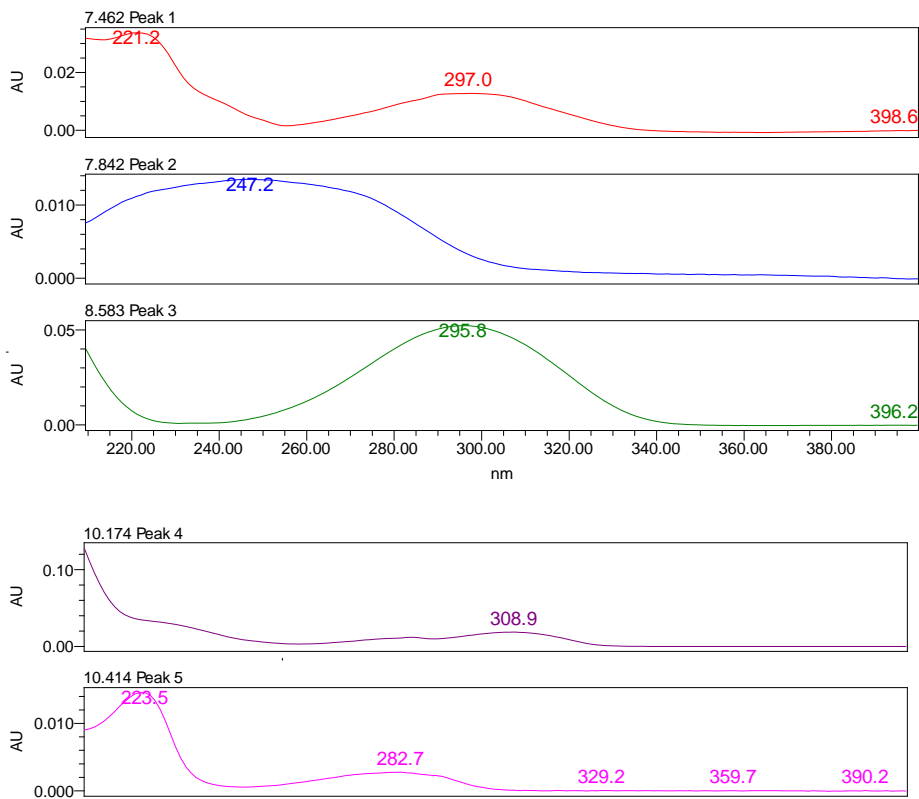


Figura 27. Identificación por UV Fuente: esta investigación

Señales cercanas al MBC

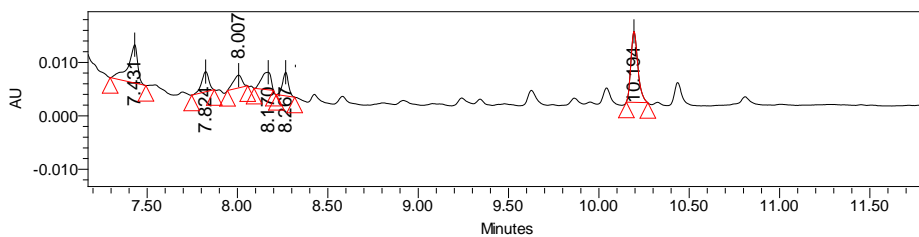
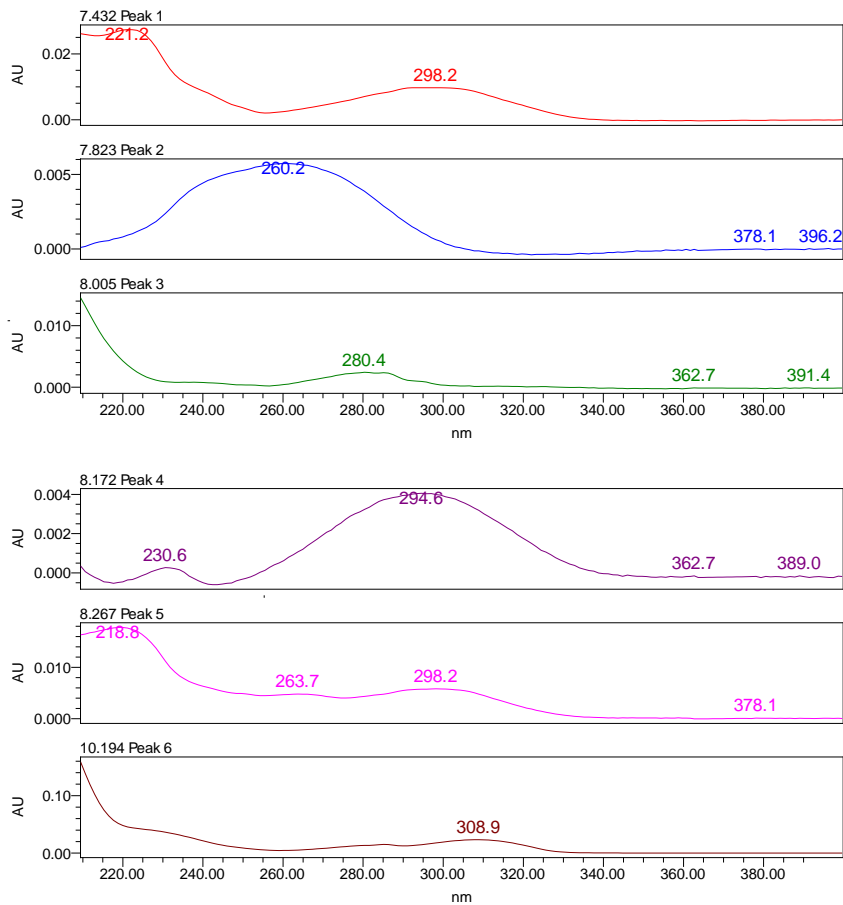
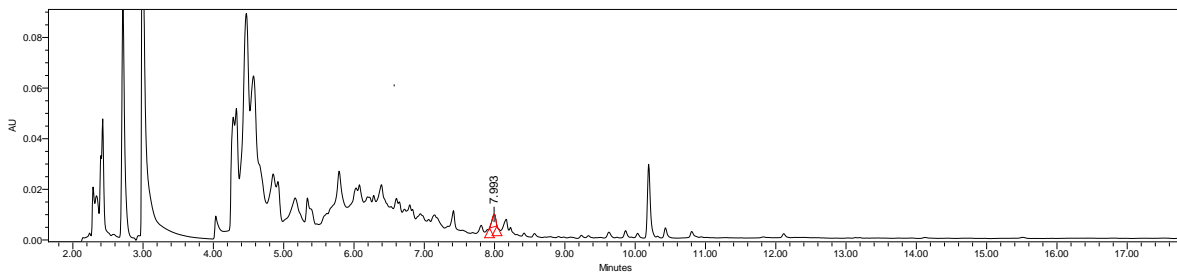


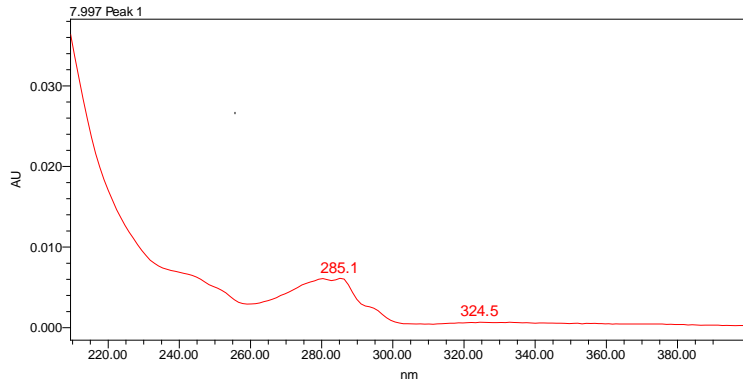
Figura 28. Tratamiento (T₂) Variedad Alcalá Fuente: esta investigación



No hay presencia de MBC, ÁREA= 0

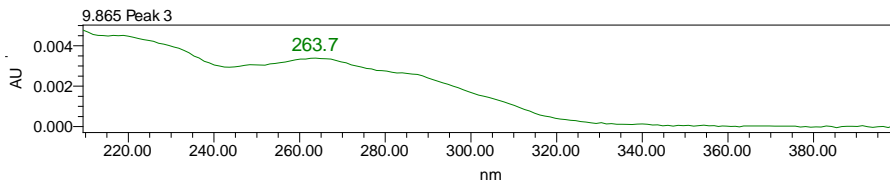
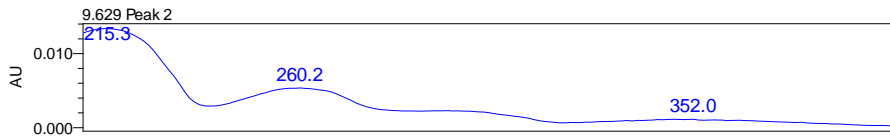
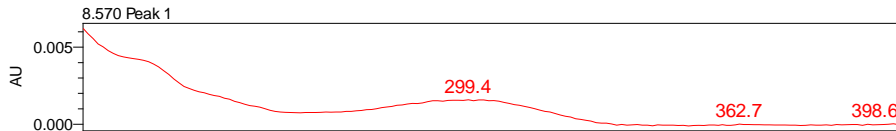
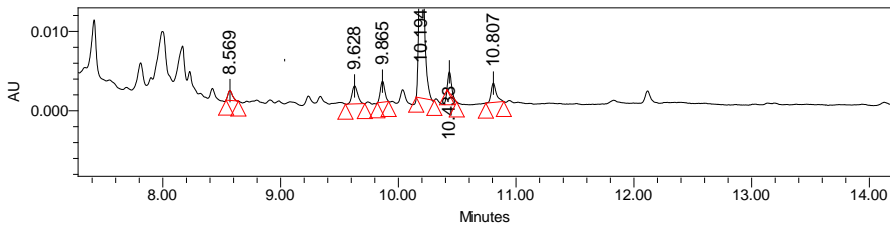
Figura 29. Identificación por UV Fuente: esta investigación





	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.993	1530	100.00	4917

Figura 30. Tratamiento (T₂) Variedad Alcalá (REPLICA) Fuente: esta investigación



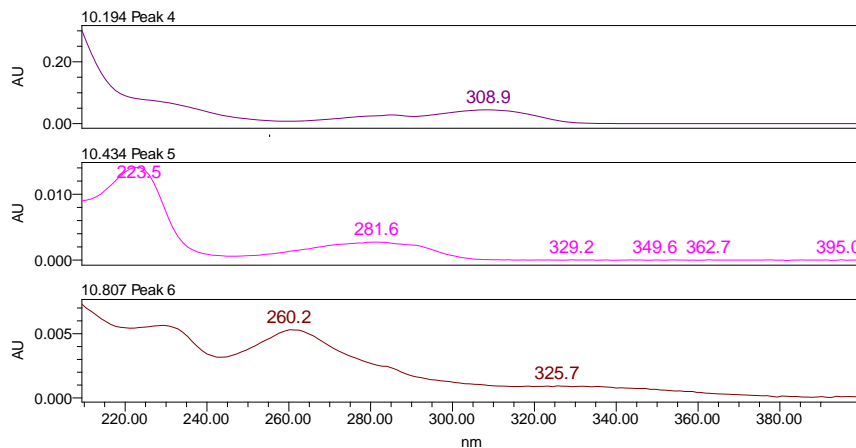
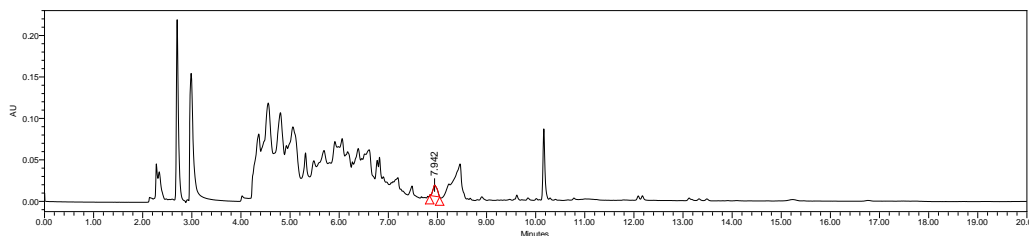


Figura 31. Señales cercanas al MBC Identificación por UV Fuente: esta investigación



Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	7.942	81725	100.00	13499

(REPLICA)

Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	7.990	89357	100.00	12105

Figura 32. Tratamiento (T₀) variedad San Isidro Fuente: esta investigación

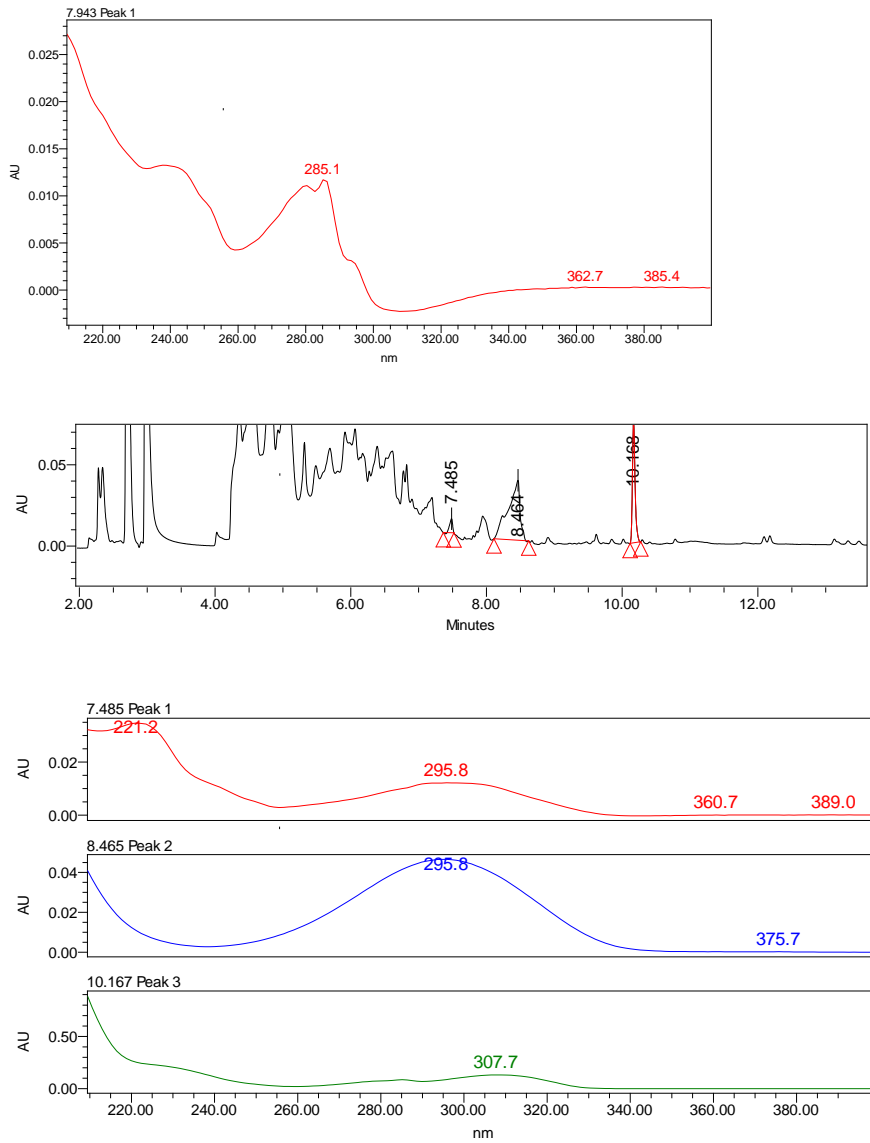
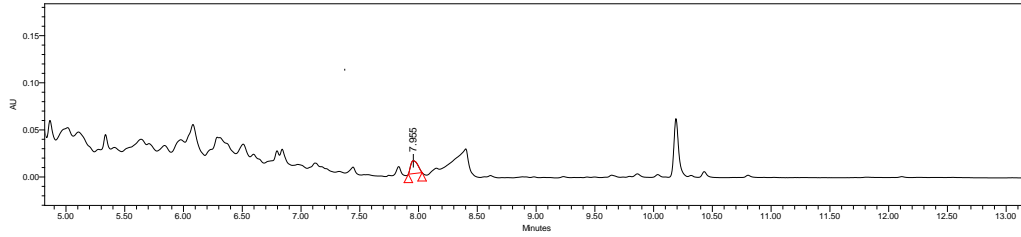


Figura 33. Señales cercanos al MBC, Identificación por UV Fuente: esta investigación



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.955	57249	100.00	13628

(REPLICA)

	Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1		7.960	43853	100.00	10448

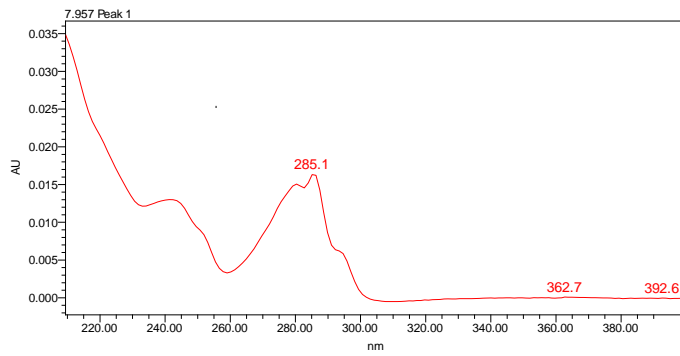
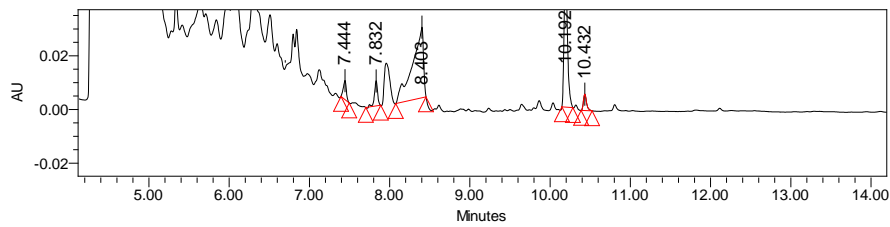


Figura 34. Tratamiento (T₁) variedad San Isidro Fuente: esta investigación



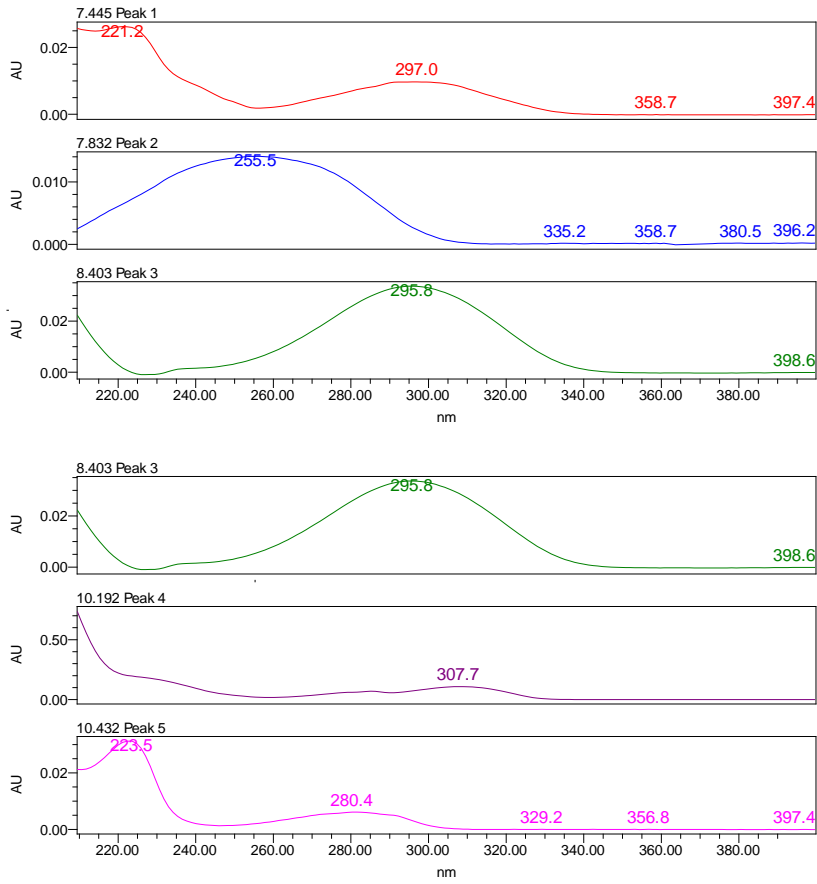
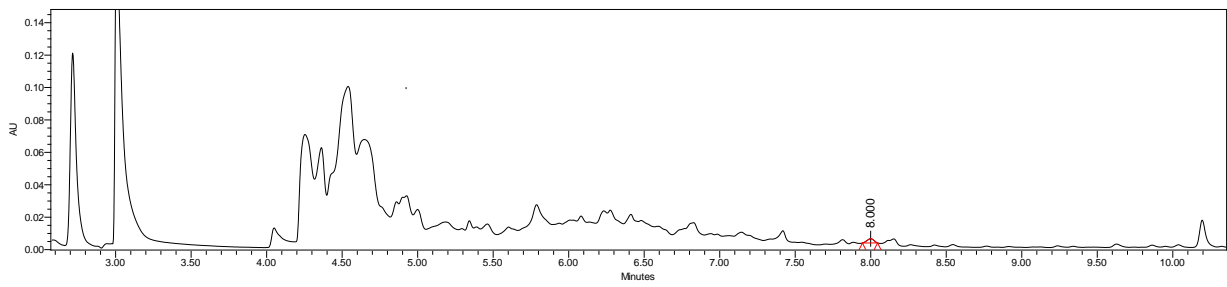


Figura 35. Señales cercanos al MBC e Identificación por UV Fuente: esta investigación



Name	Retention Time	Area	% Area	Height
1	8.000	3142	100.00	1516

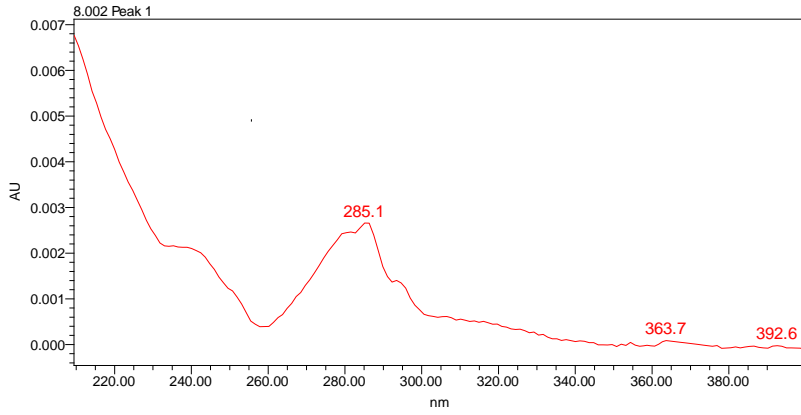
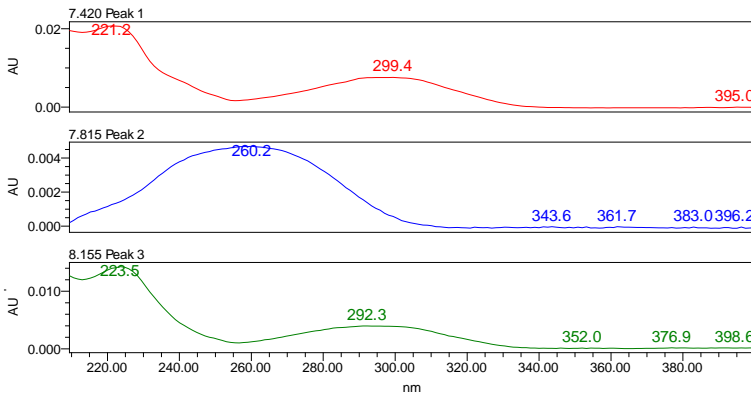
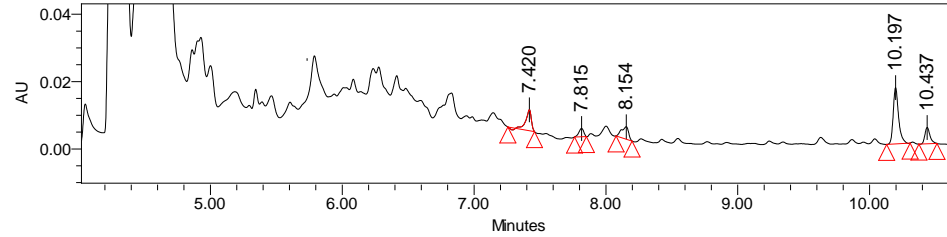
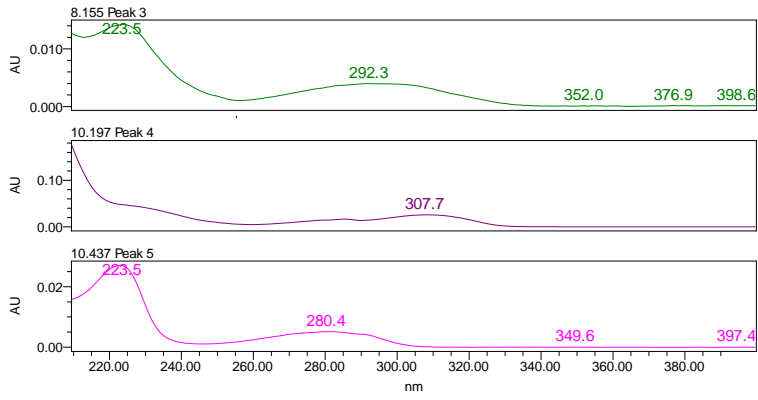


Figura 36. Tratamiento (T₂) variedad San Isidro Fuente: esta investigación
Señales cercanos al MBC

(REPLICA)

Identificación por UV





No hay presencia de MBC, ÁREA= 0

Anexo I. Curva de calibración de MBC para análisis de Vaina y etiquetas de productos comerciales.

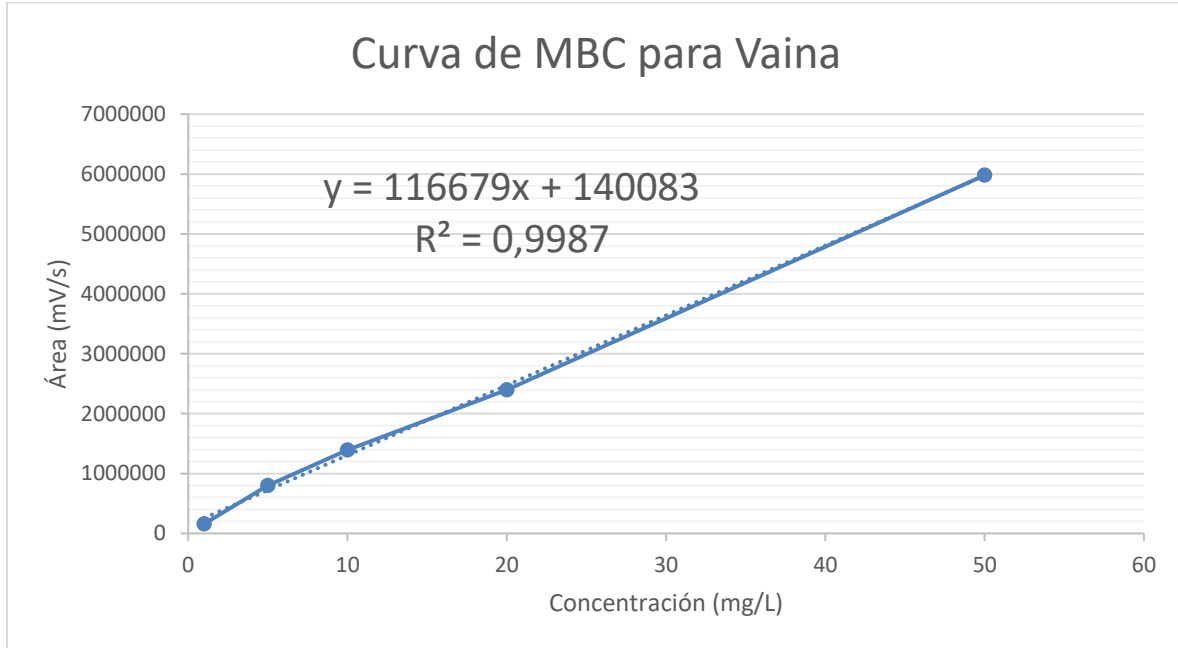


Figura 37. Curva MBC para la vaina Fuente: esta investigación



Figura 38. Fotos de productos comerciales Fuente: esta investigación

Anexo J. Certificado de los estándares

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

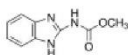
Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Carbendazim - 97%

Product Number: 378674
Batch Number: MKCB8740
Brand: ALDRICH
CAS Number: 10605-21-7
MDL Number: MFCD00055390
Formula: C₉H₉N₃O₂
Formula Weight: 191.19 g/mol
Quality Release Date: 14 NOV 2016



Test	Specification	Result
Appearance (Color) Off-White to Beige	Conforms to Requirements	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Carbon	54.6 - 58.5 %	55.9 %
Nitrogen	21.2 - 22.7 %	21.8 %
Solubility (Turbidity) C = 1%; Pyridine	Clear	Clear
Solubility (Color) Very Faint Yellow to Light Brown	Conforms to Requirements	Very Faint Yellow
Purity (HPLC)	≥ 96.5 %	99.5 %

Michael Grady, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

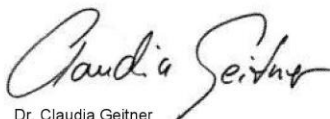
Page 1 of 1

Figura 39. Certificado estándar Carbendazim Fuente: esta investigación

Certificate of Analysis

Product Name: BENOMYL
PESTANAL□, analytical standard
Product Number: 45339
Batch Number: BCBS4287V
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 17804-35-2
Formula: C₁₄H₁₈N₄O₃
Formula Weight: 290.32
Storage Temperature: 2-8 C
Expiration Date: DEC 2021
Quality Release Date: 26 JAN 2017

TEST	SPECIFICATION	RESULT
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	98.5%
IDENTIFICATION (LC-MS)	CORRESPONDS TO REQUIREMENTS	CORRESPONDS
WATER	≤ 1.0 %	0.08 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS
REMARKS	--	PRODUCT IS NOT STABLE IN SOLUTION, PURITY IS BASED ON PRODUCT + KNOWN (+ IDENTIFIED) DEGRADATION PRODUCT CARBENDAZIM



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Figura 40. Certificado estándar Benomil. Fuente: esta investigación

Anexo K. condiciones cromatográficas

Curva de van Deemter

flujo	platos teóricos
0,8	1,42
0,9	1,13
1	0,5
1,1	0,95
1,2	1,48

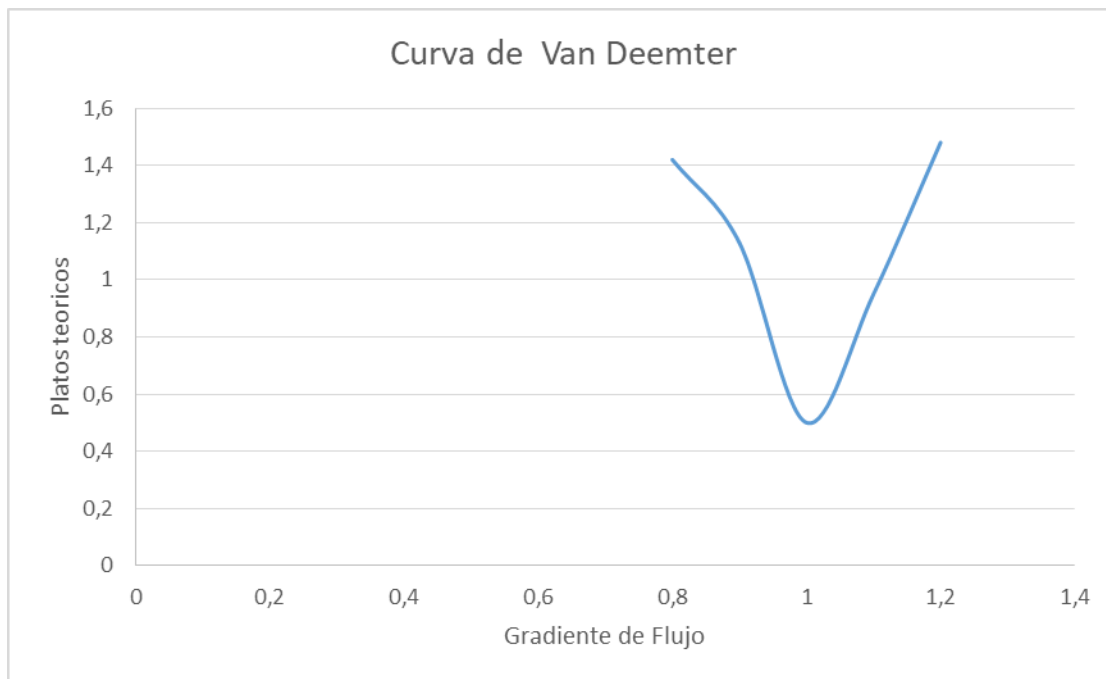


Figura 41. Curva de Van Deemter Fuente: esta investigación