

A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of chlorpyrifos and profenofos in soils by High Performance Liquid Chromatography

Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc.¹

¹Universidad Tecnológica del Perú, Av. Tacna y Arica 160, Arequipa, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

Abstract– Organophosphorus pesticides are used in agricultural activities because they are effective in the control of various pests; however, their residual nature in soils makes it necessary to promote the development of rapid methods for their identification and quantification. Therefore, in the present investigation, an ultrasound-assisted method was developed for the extraction of chlorpyrifos and profenofos from soils and their subsequent quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method proved to be linear with determination coefficients R^2 greater than 0.999, precise with variation coefficients less than 2.7 % and accurate with recovery percentages close to 100 %. The limits of detection and quantification were 0.0484 and 0.0795 mg/kg respectively for chlorpyrifos and 0.0477 and 0.1450 mg/kg respectively for profenofos. The method was simple, fast and can be used in degradation studies or for education purposes in natural sciences.

Keywords– Chlorpyrifos, profenofos, HPLC, soils, ultrasound.

Digital Object Identifier (DOI):
<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2021.1.1.589>
ISBN: 978-958-52071-8-9 ISSN: 2414-6390

Procedimiento simple y rápido de extracción asistida por ultrasonido para la determinación de clorpirifós y profenofos en suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Elvis Gilmar Gonzales-Condori, MSc.¹

¹Universidad Tecnológica del Perú, Av. Tacna y Arica 160, Arequipa, Perú, elvgonzalesc@gmail.com

Resumen— Los pesticidas organofosforados son utilizados en las actividades agrícolas debido a que resultan ser efectivas en el control de diversas plagas, sin embargo su residualidad en suelos hace necesario fomentar el desarrollo de métodos rápidos para su identificación y cuantificación, por lo cual, en la presente investigación se desarrolló un método asistido por ultrasonido para la extracción de clorpirifós y profenofos de suelos y su posterior cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El método resultó ser lineal con coeficientes de determinación R^2 mayores de 0.999, preciso con coeficientes de variación menores del 2.7 % y exacto con porcentajes de recuperación cercanos al 100 %. Los límites de detección y cuantificación fueron de 0.0484 y 0.0795 mg/kg respectivamente para clorpirifós y 0.0477 y 0.1450 mg/kg respectivamente para profenofos. El método resultó ser simple, rápido y se puede utilizar en estudios de degradación o con fines de educación en ciencias naturales.

Palabras clave—Clorpirifós, profenofos, HPLC, suelos, ultrasonido.

Abstract— Organophosphorus pesticides are used in agricultural activities because they are effective in the control of various pests; however, their residual nature in soils makes it necessary to promote the development of rapid methods for their identification and quantification. Therefore, in the present investigation, an ultrasound-assisted method was developed for the extraction of chlorpyrifos and profenofos from soils and their subsequent quantification by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method proved to be linear with determination coefficients R^2 greater than 0.999, precise with variation coefficients less than 2.7 % and accurate with recovery percentages close to 100 %. The limits of detection and quantification were 0.0484 and 0.0795 mg/kg respectively for chlorpyrifos and 0.0477 and 0.1450 mg/kg respectively for profenofos. The method was simple, fast and can be used in degradation studies or for education purposes in natural sciences.

Keywords— Chlorpyrifos, profenofos, HPLC, soils, ultrasound.

I. INTRODUCCIÓN

Los agroquímicos como los pesticidas son utilizados para el control de plagas en la agricultura[1], sin embargo, pueden ocasionar posibles efectos secundarios perjudiciales para otros organismos vivos a los que se exponen inadvertidamente[2]. Principalmente, resultan ser una amenaza para los ecosistemas de agua dulce y se ha demostrado que son responsables de la pérdida de la microbiota esencial del suelo que podría traer consecuencias a la agricultura a largo plazo[3].

Particularmente, el ser humano puede exponerse a estos pesticidas de forma profesional u ocupacional reportándose una importante asociación de la exposición de plaguicidas con enfermedades como leucemia, linfomas, sarcomas de tejidos blandos y cánceres cerebrales, óseos, y estomacales en agricultores, pulverizadores y trabajadores de la producción[4]. Por ello, el uso inadecuado de estos agroquímicos resultan ser un problema a nivel mundial. En Arequipa-Perú el uso de pesticidas es elevado en cultivos como cebolla, ajo, alfalfa, etc. siendo los pesticidas organofosforados de primera elección por los agricultores entre los cuales están el clorpirifós y profenofos.

Conociendo la residualidad de estos pesticidas es necesario plantear alternativas para su extracción y cuantificación ya sea para el monitoreo o estudios de degradación de estos compuestos orgánicos tóxicos en suelos. En este sentido, la literatura establece una metodología basada en un método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro abreviado como QuEChERS por sus siglas en inglés[5] que consiste principalmente en una extracción/partición con acetonitrilo seguido de una limpieza de extracción en fase sólida (EFS) dispersiva, además, hoy en día se plantean algunas modificaciones que hacen factible su aplicación en muestras de suelo encontrando resultados precisos y exactos[6]–[8], además, los estudios comparativos también han revelado que las recientes mejoras como la microextracción en fase sólida (MEFS) han permitido minimizar la inestabilidad de los pesticidas debido al efecto matriz y obtener extractos más limpios[9]. A esto se suman estudios que buscan combinar otros métodos de extracción como la extracción ultrasónica (EU) y extracción por Soxhlet (ES), seguidos de una limpieza mediante EFS[10], como también, la extracción micelar asistida por microondas junto con la MEFS [11]. Estos métodos son ampliamente estudiados y modificados con la finalidad de adaptarlos a diferentes matrices y condiciones[12]–[16]. Asimismo, existen otros métodos como la microextracción en fase líquida[17]–[19] y la microextracción con membrana de fibra hueca para la determinación de pesticidas en otras matrices[20]–[23]. Sin embargo, la disponibilidad de reactivos y equipamiento hacen muchas veces que la aplicación de estos métodos rápidos sea de difícil implementación, por lo cual, es importante desarrollar más alternativas de procedimientos rápidos,

precisos y exactos para promover el desarrollo de estudios de cuantificación de pesticidas en suelos. Estos métodos desarrollados deben seguir procesos de validación para garantizar su confiabilidad o validez, ya que, el proceso de validación de un método bien definido y documentado puede proporcionar pruebas de que el sistema y el método son adecuados para su uso previsto, ayudar a transferir el método y satisfacer el cumplimiento de la normativa[24]. En la validación de métodos, todos los resultados se obtienen en el desarrollo de procedimientos de medición[25], para esto se deben evaluar parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud[26]. Por lo expuesto, en la presente investigación se propone, desarrolla y valida un procedimiento simple y rápido de extracción y limpieza en un solo paso asistido por ultrasonido para la cuantificación de clorpirifós y profenofos de suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Reactivos y equipos

Los estándares de clorpirifós y profenofos fueron adquiridos de Sigma Aldrich. El acetonitrilo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución (grado HPLC) fue obtenido de Merck. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. El agua ultrapura fue obtenida del purificador de agua Simplicity System Merck Millipore. Se utilizó una columna Chromolith RP-18e de 4.6 x 100 mm, un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) con arreglo de diodos HPLC-DAD Hitachi Chromaster, un sonicador (Limpiador ultrasónico) Branson 2800 de 40 kHz.

B. Condiciones cromatográficas para cuantificar clorpirifós y profenofos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Para la cuantificación clorpirifós y profenofos por HPLC en primer lugar se prepararon dos soluciones de 3 mg/L en acetonitrilo grado HPLC de ambos pesticidas a partir de los estándares Sigma. Las soluciones fueron filtradas en un filtro WHATMAN de 45 µm NYL. Una vez filtradas, 20 µL de estas soluciones fueron inyectadas al HPLC para hacer un barrido de 190 a 300 nm con la finalidad de elegir la longitud de onda de trabajo para la cuantificación simultánea de ambos organofosforados.

Los tiempos de retención fueron identificados utilizando una fase móvil de acetonitrilo: agua ultra pura (60:40) un flujo de 2 mL.min⁻¹, a la longitud de onda de máxima absorbancia que permita cuantificar ambos organofosforados, asimismo, en este proceso también se pudo definir el tiempo de corrida cromatográfica.

C. Extracción de clorpirifós y profenofos de suelos

Se desarrolló un método simple y rápido que permite la extracción simultánea de clorpirifós y profenofos de suelos. El

proceso se esquematiza en la Figura 1. Dicho proceso consiste en acondicionar una jeringa de vidrio de 20 mL con 2 discos de papel filtro rápido de 2 cm de diámetro, posteriormente se adiciona 2 gramos de sulfato de sodio anhidro para la limpieza, luego se agrega 5 gramos de suelo en estudio y finalmente se agrega 10 mL de acetonitrilo grado HPLC. El sistema de extracción en jeringa se somete a un baño de ultrasonido de 40 kHz durante 15 minutos y se filtra al vacío recogiendo el solvente en un tubo de ensayo. El proceso de extracción asistida por ultrasonido se repite con 5 mL de acetonitrilo grado HPLC para asegurar extracción de los organofosforados, posteriormente se filtra al vacío por segunda vez en el mismo tubo de ensayo. Posteriormente, el solvente recuperado se evaporó utilizando N₂ (g), luego se reconstituyó con acetonitrilo grado HPLC, finalmente esta solución resultante fue en un filtro WHATMAN de 45 µm NYL para su posterior análisis por HPLC.

D. Validación del método para cuantificar clorpirifós y profenofos en suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

El método fue validado evaluando los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud y el proceso detalla a continuación.

a. Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon seis soluciones de calibración de clorpirifós y profenofos a partir de los estándares sigma. Las concentraciones de estas soluciones fueron de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/L las cuales fueron preparadas en acetonitrilo grado HPLC posteriormente fueron analizadas por HPLC a condiciones establecidas. Este proceso se desarrolló por triplicado. El coeficiente de determinación R^2 fue utilizado para evaluar el parámetro de linealidad. Por otro lado, se determinó la ecuación de la recta basada en la ecuación general que se muestra a continuación:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Donde, “x” corresponde a la concentración de los organofosforados en estudio expresada en mg/L, “y” es el área expresada en mili unidades de absorbancia (mAU) que se obtiene de las lecturas de las muestras por HPLC a condiciones cromatográficas establecidas. “a” corresponde al intercepto con el eje x y “b” a la pendiente de la recta.

b. Sensibilidad

La sensibilidad del método se determinó calculando los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) en mg/L que corresponden a la mínima cantidad de cada organofosforado (OFF) que el método puede determinar, pero no cuantificar (LD) y la mínima cantidad de cada OFF que el método puede

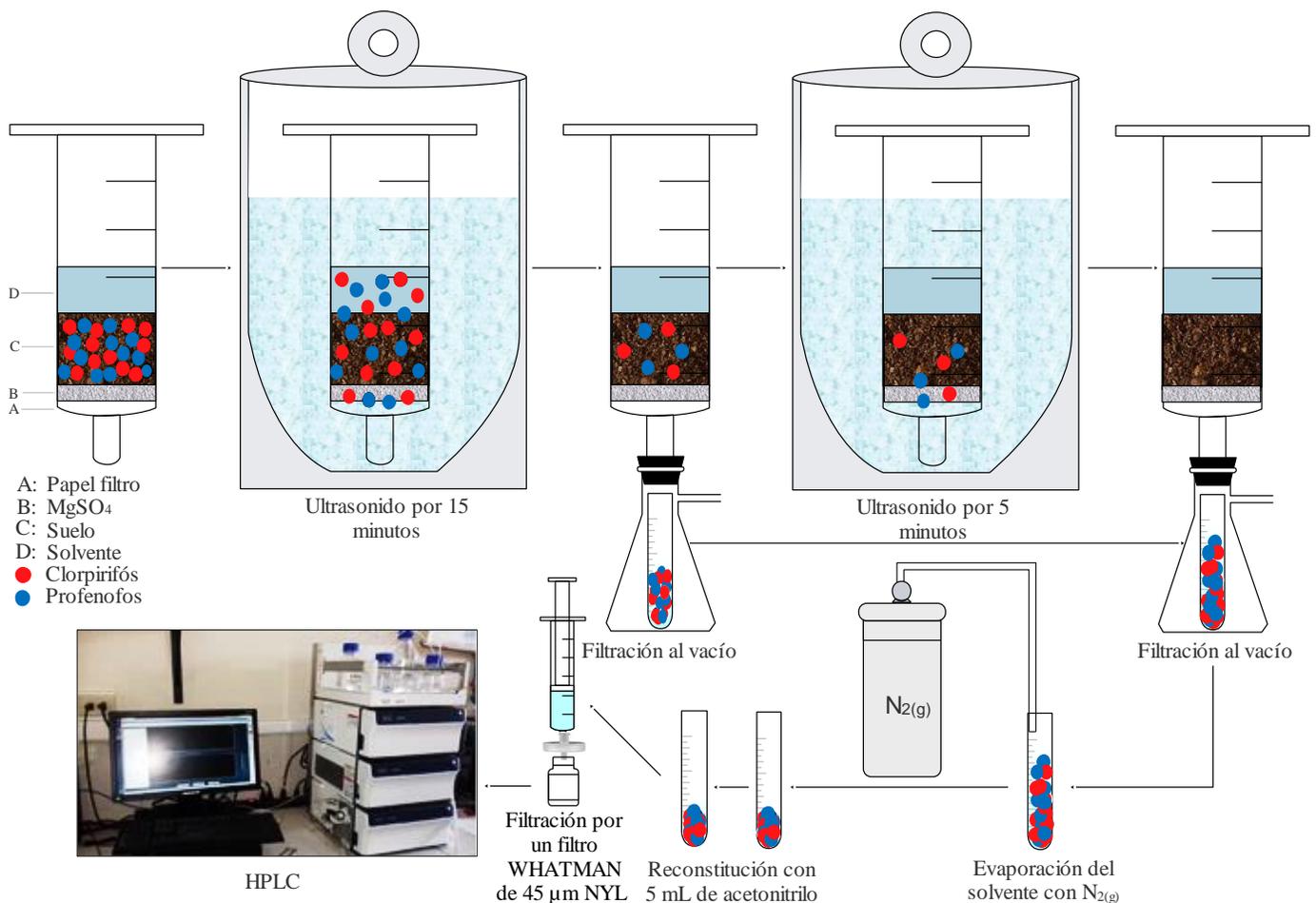


Fig. 1. Diagrama esquemático del procedimiento de extracción de clorpirifós y profenofos de suelos contaminados.

cuantificar con precisión y exactitud (LC). Para el cálculo, se utilizaron las siguientes ecuaciones

$$LD = \frac{y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

$$LC = \frac{y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Donde, “ y_{bl} ” corresponde al intercepto (a) de la ecuación (1), “ S_{bl} ” corresponde al intercepto de la ecuación de la recta que relaciona la concentración de cada organofosforado con la desviación estándar de las absorbancias halladas por triplicado en el ensayo de linealidad y “ n ” corresponde al número de soluciones de calibración que fueron seis.

c. Precisión

Para determinar la precisión del método se prepararon suelos contaminados con aproximadamente 1 mg/kg de

clorpirifós y profenofos. Los suelos contaminados fueron preparados a partir de los pesticidas comerciales Tifon® y Seleccion® que presentaban concentraciones de 480 y 500 g/L de clorpirifós y profenofos respectivamente. Se disolvieron volúmenes adecuados de cada solución comercial en n-hexano para luego poner esta solución en contacto con arena fina. Una vez evaporado el solvente de la arena fina contaminada fue dispersada homogéneamente en suelos agrícolas que fueron previamente tamizados en un tamiz ASTM (American Society for Testing and Materials) con rejilla de 2 mm. Se prepararon seis muestras de 0.5 kg de suelo por el proceso descrito anteriormente. Para la cuantificación de cada OFF se desarrolló un muestreo por cuarteo, finalmente, se tomaron 5 g de muestra de suelo y se procedió con la extracción de ambos OFF que posteriormente fueron analizados por HPLC. La precisión se determinó mediante el cálculo del coeficiente de variación (CV) usando la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (4)$$

Donde: “ \bar{x} ” es el promedio de las seis mediciones y “ s ” corresponde a la desviación estándar.

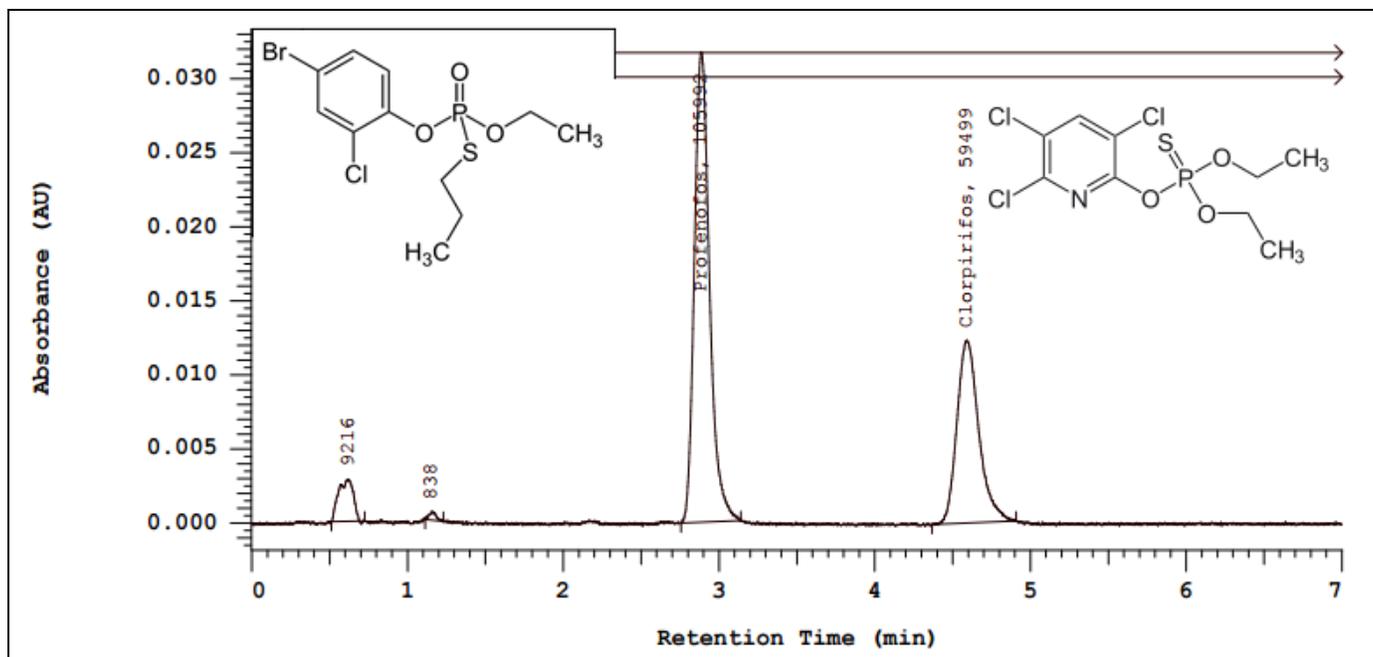


Fig. 2. Cromatograma a 205 nm correspondiente a profenofos y clorpirifos con tiempos de retención de 2.9 y 4.6 minutos respectivamente.

d. Exactitud

La exactitud del método fue determinada hallando el porcentaje de recuperación (%R). Para este apartado se prepararon suelos contaminados a 2 mg/kg a partir de las soluciones comerciales en suelo. La preparación se realizó en suelos donde no se hayan utilizado organofosforados ya que en el ensayo de precisión se encontró que los suelos presentaban residualidad de los pesticidas en estudio.

El proceso de preparación se desarrolló de la misma forma que en el apartado anterior. Una vez preparados los suelos (n=6) se analizaron por HPLC calculando la concentración inicial de cada organofosforado (C_i), posteriormente se enriquecieron estos suelos con una concentración de 1 mg/kg cada organofosforado (concentración en arena, C_{es}) utilizando los estándares Sigma. Posteriormente se calculó la concentración de cada organofosforado en los suelos enriquecidos (C_e). Para el cálculo del % R se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{C_e - C_i}{C_{es}} \times 100 \quad (5)$$

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 3 y 4 se presentan los barridos de las soluciones de 3 mg/L de clorpirifós y profenofos respectivamente. En la Figura 3 se observa que el clorpirifós

presenta tres picos en el espectro de absorción a 205 nm, 230 nm y 290 nm, siendo el pico más alto a 205 nm. Por otro lado, en la Figura 4 se nota que el profenofos presenta un solo pico sobresaliente en el espectro de absorción siendo este a 205 nm.

Analizando ambos espectros se observan que a 205 nm ambos espectros presentan su máxima absorción de luz UV por lo que se utilizó esta longitud de onda para la cuantificación de ambos organofosforados.

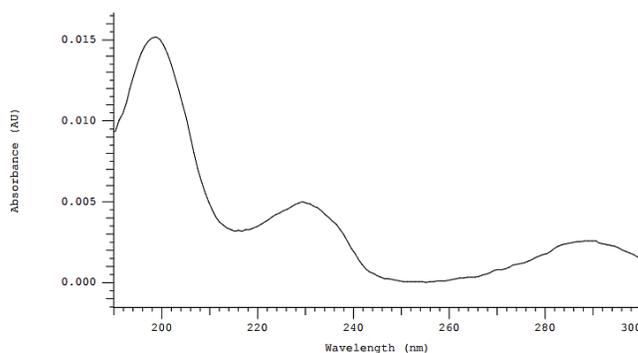


Fig. 3. Espectro de absorción de clorpirifós de 190 a 300 nm.

En la Figura 2 se observan los tiempos de retención para profenofos y clorpirifós de 2.9 y 4.6 minutos respectivamente a un flujo de 2 mL/min, una longitud de onda de 205 nm con una fase móvil de acetonitrilo: agua (60:40).

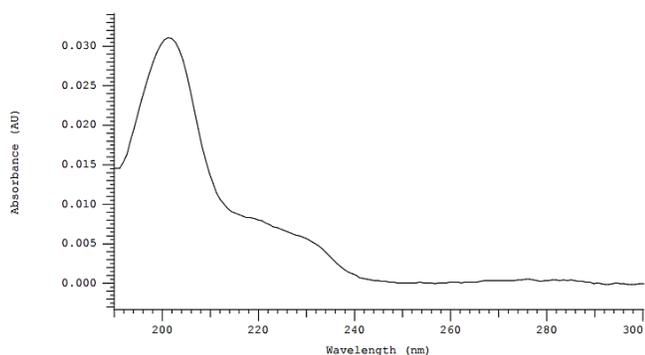


Fig. 4. Espectro de absorción de profenofos de 190 a 300 nm.

Por otro lado, en la Figura 5 se presenta el gráfico de calibración donde relaciona la concentración de clorpirifós y profenofos con el área en mAU obtenida luego de la lectura de estas soluciones por HPLC. Los coeficientes R^2 fueron mayores que 0.995 lo cual indica que el método para la cuantificación de ambos organofosforados es lineal [26].

Los límites de detección y cuantificación del método para clorpirifós fueron de 0.0484 y 0.0795 mg/kg respectivamente. Por otro lado, los límites de detección y cuantificación para profenofos fueron de 0.0477 y 0.1450 mg/kg respectivamente.

En la Tabla I se presentan los resultados de la evaluación de la precisión del método donde se observan los coeficientes de variación (CV) de la cuantificación de clorpirifós y profenofos en suelo logrando CV menores de 2.7 % [26], lo que indica la precisión del método

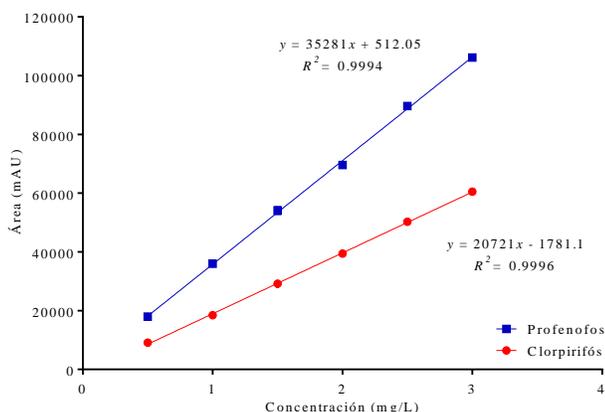


Fig. 5. Gráfico de calibración de clorpirifós ($R^2=0.9996$) y profenofos ($R^2=0.9994$).

También se puede observar en la Tabla I que los suelos utilizados presentaron residualidad de pesticidas ya que se añadió estos organofosforados en una concentración aproximada a 1 mg/kg y en dicha tabla se observa que las concentraciones superan este valor siendo la concentración promedio para clorpirifós de 2.53 mg/kg y para profenofos de 1.52 mg/kg

TABLA I
COEFICIENTES DE VARIACIÓN PORCENTUAL DEL ENSAYO DE PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CLORPIRIFÓS Y PROFENOFOS EN SUELOS

Repetición	Concentración (mg/kg)	
	Clorpirifós	Profenofos
1	2.48	1.56
2	2.51	1.49
3	2.65	1.56
4	2.52	1.48
5	2.51	1.52
6	2.50	1.50
Promedio	2.53	1.52
Desviación estándar	0.06	0.03
CV (%)	2.37	2.27

*CV: Coeficiente de variación

Finalmente, en la Tabla II se observan los resultados del ensayo de exactitud. En la tabla se muestran los porcentajes de recuperación ($\%R$) de cada ensayo de exactitud que fue repetido seis veces. El promedio de los $\%R$ de las repeticiones para cada organofosforado en estudio fueron 90.48 y 99.06 % para clorpirifós y profenofos respectivamente. Para que un método sea considerado exacto el porcentaje de recuperación debería estar entre 90 y 110 % [26], por lo tanto, el método para la cuantificación de clorpirifós resulta ser exacto.

TABLA II
PORCENTAJES DE RECUPERACIÓN DEL ENSAYO DE EXACTITUD DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR CLORPIRIFÓS Y PROFENOFOS EN SUELOS

OFF	Muestra (mg/L)	Estándar (mg/L)	Muestra + adición estándar (mg/L)	$\%R$
PFF	1.89	0.98	2.68	89.91
	1.73	0.97	2.55	91.22
	1.84	1.00	2.70	92.67
	1.94	1.00	2.70	87.22
	1.87	0.99	2.69	91.07
	1.80	1.00	2.64	90.79
CPF	1.73	1.02	2.74	99.29
	1.75	1.03	2.77	99.64
	1.76	1.00	2.72	97.61
	1.68	1.03	2.70	99.06
	1.71	1.02	2.69	97.24
	1.72	1.00	2.75	101.51

*PFF: profenofos, CPF: Clorpirifós, OFF: Organofosforado

La literatura actual propone mejoras del método QuEChERS como el estudio de Zaidon et al. [6] que desarrolló un procedimiento basado en extracción en fase sólida para el análisis de multiresiduos de trece pesticidas logrando coeficientes R^2 para todos los analitos superiores a 0.999 con recuperaciones entre 74 y 111 % y límites de detección del método entre 0.03 y 0.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Asimismo, Acosta-Dacal et al. [8] optimizaron, validaron y verificaron un método QuEChERS modificado para la extracción de 218 residuos de plaguicidas en muestras de suelos agrícolas en un solo paso, sin limpieza, con calibración ajustada a la matriz logrando como resultado un método lineal, exacto y preciso, con límites de cuantificación inferiores al límite típicamente utilizado en suelos (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ya que sus valores oscilaron entre 0.024 y 6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos métodos cumplen con los

parámetros de linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad aceptable, sin embargo, estos métodos a pesar de ser rápidos y validados presentan varios pasos para su ejecución que con la presente investigación se están simplificando, ya que, el método de extracción y limpieza se da en un solo paso (Figura 1) cumpliendo con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud (Tablas I y II), además, el tiempo de extracción es similar a los estudios donde mejoran el método QuEChERS.

Respecto al uso de ultrasonido en el proceso de extracción Kunene et al [10] optimizaron un procedimiento ultrasónico donde utilizaron 1 g de muestra de suelo/sedimento y el proceso consistió en aplicar ultrasonido por 30 minutos en dos pasos logrando resultados exactos con sensibilidad aceptable, también, estudiaron el efecto del tiempo de extracción utilizando 15, 30 y 45 minutos de ultrasonido encontrando que las recuperaciones aumentaron con el incremento del tiempo de extracción de 15 a 30 minutos, sin embargo, a un tiempo prolongado de 40 minutos disminuyeron. En la presente investigación se utiliza 15 minutos de aplicación de ultrasonido a 40 kHz seguido de una segunda aplicación de 5 minutos y se obtuvo recuperaciones cercanas al 100 %, lo cual, corrobora el estudio de Kunene et al. que encontraron resultados similares en cuanto a la recuperación, lo cual, descarta la degradación del pesticida en el tiempo empleado, por otro lado, en la presente investigación se utilizó un limpiador ultrasónico a 40 kHz, respecto a esto, Ahmadi et al. [27] en su estudio utilizó la misma frecuencia y obtuvo recuperaciones cercanas al 100 %, lo cual, indica que la aplicación de 15 minutos de ultrasonido a 40 kHz es segura para evitar la degradación de los pesticidas.

IV. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método asistido por ultrasonido a una frecuencia de 40 kHz para la extracción y purificación en un solo paso, y posterior cuantificación de clorpirifós y profenofos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El método por HPLC con 20 µL de volumen de inyección, una fase móvil de acetonitrilo: agua (60:40), flujo de 2 mL/min, un tiempo de corrida de 7 minutos resultó ser lineal, preciso, exacto, con límites de detección y cuantificación de 0.0484 y 0.0795 mg/kg respectivamente para clorpirifós y 0.0477 y 0.1450 mg/kg respectivamente para profenofos. El método resulto se simple, rápido y puede emplearse en estudios de degradación o con fines de educación y se puede extender a otros pesticidas.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su agradecimiento al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) por financiar esta investigación mediante el contrato N°144-2020- FONDECYT.

- [1] S. Ganesan, M. J. Dickson, y A. F. Keating, «Pesticides», en *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, M. K. Skinner, Ed. Oxford: Academic Press, 2018, pp. 724-730. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64412-4.
- [2] T. Svingen, S. Christiansen, C. Taxvig, y A. M. Vinggaard, «Pesticides», en *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, M. K. Skinner, Ed. Oxford: Academic Press, 2018, pp. 624-628. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.64383-0.
- [3] S. Stehle y R. Schulz, «The Impact of Pesticides on Our Freshwater Resources», en *Encyclopedia of the Anthropocene*, D. A. Dellasala y M. I. Goldstein, Eds. Oxford: Elsevier, 2018, pp. 127-132. doi: 10.1016/B978-0-12-809665-9.09978-X.
- [4] C. Bolognesi y F. D. Merlo, «Pesticides: Human Health Effects», en *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*, J. Nriagu, Ed. Oxford: Elsevier, 2019, pp. 118-132. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11818-4.
- [5] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, y F. J. Schenck, «Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce», *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, vol. 86, n.º 2, pp. 412-431, mar. 2003, doi: 10.1093/jaoac/86.2.412.
- [6] S. Z. Zaidon, Y. B. Ho, H. Hamsan, Z. Hashim, N. Saari, y S. M. Praveena, «Improved QuEChERS and solid phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in paddy soil and water using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry», *Microchemical Journal*, vol. 145, pp. 614-621, mar. 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.11.025.
- [7] D. Orazbayeva, J. A. Koziel, M. J. Trujillo-Rodríguez, J. L. Anderson, y B. Kenessov, «Polymeric ionic liquid sorbent coatings in headspace solid-phase microextraction: A green sample preparation technique for the determination of pesticides in soil», *Microchemical Journal*, vol. 157, p. 104996, sep. 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.104996.
- [8] A. Acosta-Dacal, C. Rial-Berriel, R. Díaz-Díaz, M. del M. Bernal-Suárez, y O. P. Luzardo, «Optimization and validation of a QuEChERS-based method for the simultaneous environmental monitoring of 218 pesticide residues in clay loam soil», *Science of The Total Environment*, vol. 753, p. 142015, ene. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142015.
- [9] J. da Silva Sousa, H. O. do Nascimento, H. de Oliveira Gomes, y R. F. do Nascimento, «Pesticide residues in groundwater and surface water: recent advances in solid-phase extraction and solid-phase microextraction sample preparation methods for multiclass analysis by gas chromatography-mass spectrometry», *Microchemical Journal*, vol. 168, p. 106359, sep. 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106359.

- [10] P. N. Kunene y P. N. Mahlambi, «Optimization and application of ultrasonic extraction and Soxhlet extraction followed by solid phase extraction for the determination of triazine pesticides in soil and sediment», *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 8, n.º 2, p. 103665, abr. 2020, doi: 10.1016/j.jece.2020.103665.
- [11] D. V. Moreno, Z. S. Ferrera, y J. J. S. Rodríguez, «Microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in soil samples», *Analytica Chimica Acta*, vol. 571, n.º 1, pp. 51-57, jun. 2006, doi: 10.1016/j.aca.2006.04.046.
- [12] R.-A. Doong y P.-L. Liao, «Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction», *Journal of Chromatography A*, vol. 918, n.º 1, pp. 177-188, may 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00740-3.
- [13] M. S. Jagirani y M. Soylak, «A review: Recent advances in solid phase microextraction of toxic pollutants using nanotechnology scenario», *Microchemical Journal*, vol. 159, p. 105436, dic. 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105436.
- [14] A. Salemi, N. Khaleghifar, y N. Mirikaram, «Optimization and comparison of membrane-protected micro-solid-phase extraction coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for organochlorine pesticides using three different sorbents», *Microchemical Journal*, vol. 144, pp. 215-220, ene. 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.09.011.
- [15] F. Monajemzadeh, A. Mohebbi, M. A. Farajzadeh, M. Nematí, y M. R. Afshar Mogaddam, «Dispersive solid phase extraction combined with in syringe deep eutectic solvent based dispersive liquid-liquid microextraction for determination of some pesticides and their metabolite in egg samples», *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 96, p. 103696, mar. 2021, doi: 10.1016/j.jfca.2020.103696.
- [16] A. Bouaid, L. Ramos, M. J. Gonzalez, P. Fernández, y C. Cámara, «Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography», *Journal of Chromatography A*, vol. 939, n.º 1, pp. 13-21, dic. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01332-2.
- [17] L. Hou y H. K. Lee, «Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, vol. 1038, n.º 1, pp. 37-42, jun. 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.03.012.
- [18] X. Li *et al.*, «Ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction method based on deep eutectic solvent as extraction solvent for determination of five pesticides in traditional Chinese medicine», *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 166, pp. 213-221, mar. 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.01.018.
- [19] B. Y. Durak, D. S. Chormey, M. Firat, y S. Bakirdere, «Validation of ultrasonic-assisted switchable solvent liquid phase microextraction for trace determination of hormones and organochlorine pesticides by GC–MS and combination with QuEChERS», *Food Chemistry*, vol. 305, p. 125487, feb. 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125487.
- [20] C. Basheer, H. K. Lee, y J. P. Obbard, «Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fibre membrane microextraction and gas chromatography–mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, vol. 968, n.º 1, pp. 191-199, ago. 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(02)00793-8.
- [21] C. Basheer, V. Suresh, R. Renu, y H. K. Lee, «Development and application of polymer-coated hollow fiber membrane microextraction to the determination of organochlorine pesticides in water», *Journal of Chromatography A*, vol. 1033, n.º 2, pp. 213-220, abr. 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.01.050.
- [22] F. Darvishnejad, J. B. Raouf, y M. Ghani, «MIL-101 (Cr) @ graphene oxide-reinforced hollow fiber solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography to determine diazinon and chlorpyrifos in tomato, cucumber and agricultural water», *Analytica Chimica Acta*, vol. 1140, pp. 99-110, dic. 2020, doi: 10.1016/j.aca.2020.10.015.
- [23] M. Zuluaga, L. Yathe-G, M. Rosero-Moreano, y G. Taborda-Ocampo, «Multi-residue analysis of pesticides in blood plasma using hollow fiber solvent bar microextraction and gas chromatography with a flame ionization detector», *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 82, p. 103556, feb. 2021, doi: 10.1016/j.etap.2020.103556.
- [24] M. Swartz, «CHROMATOGRAPHY | Method Validation», en *Encyclopedia of Separation Science*, I. D. Wilson, Ed. Oxford: Academic Press, 2007, pp. 1-7. doi: 10.1016/B978-012226770-3/10695-8.
- [25] P. Konieczka, «2.31 - Validation and Regulatory Issues for Sample Preparation», en *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, J. Pawliszyn, Ed. Oxford: Academic Press, 2012, pp. 699-711. doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00064-8.
- [26] O. Quattrocchi, S. Abelaira, y R. Felipe Laba, *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica*. 1992.
- [27] K. Ahmadi, Y. Abdollahzadeh, M. Asadollahzadeh, A. Hemmati, H. Tavakoli, y R. Torkaman, «Chemometric assisted ultrasound leaching-solid phase extraction followed by dispersive-solidification liquid–liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in soil samples», *Talanta*, vol. 137, pp. 167-173, may 2015, doi: 10.1016/j.talanta.2015.01.031.