

## LIMPIEZA POR CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN POR GEL EN LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE N-METILCARBAMATOS EN FRESA

### GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY CLEAN-UP IN DETERMINATION OF N-METHYLCARBAMATES RESIDUES IN STRAWBERRY

### LIMPEZA POR CROMATOGRAFIA DE PERMEACAO EM GEL EM DETERMINACAO DE RESIDUOS N-METIL CARBAMATOS EM MORANGO

Eliana M. Valencia<sup>1</sup>, Jairo A. Guerrero<sup>2</sup>

Recibido: 15/02/08 – Aceptado: 27/07/08

#### RESUMEN

Se validó e implementó un método multirresiduo para la determinación de cinco plaguicidas N-metilcarbamatos (N-MC) y cuatro metabolitos de estos en fresa. La extracción se realizó con acetato de etilo. La limpieza se llevó a cabo por cromatografía de permeación en geles (CPG) utilizando como fase estacionaria un polímero de estireno divinilbenceno a 3 % de entrecruzamiento empacado en una columna de vidrio de 20 cm x 10 mm D.I. y un solvente de elución compuesto por acetato de etilo ciclohexano (1:1) a un flujo de 1 mL/min. Se encontró que al eliminar los primeros 7 mL se eliminaban los interferentes de la matriz, y que en la fracción de 7 a 22 mL se encontraban los N-metilcarbamatos y sus metabolitos. La determinación final se realizó por HPLC

con derivatización pos-columna y detección por fluorescencia usando una columna C-18 de 25 cm x 4.6 mm D.I., 5  $\mu$ m, y un gradiente de elución compuesto de acetonitrilo, metanol y agua. Con la limpieza llevada a cabo se mostró que el método es específico, selectivo, lineal en un rango de concentraciones desde 0,12 hasta 2,31 mg/kg, suficientemente sensible con límites de detección y cuantificación entre 0,011 – 0,021 mg/kg y 0,021 – 0,075 mg/kg, respectivamente, preciso y exacto con recuperaciones entre el 80 y el 110 %. El método validado se utilizó para determinar residuos de N-MC y sus metabolitos en muestras de fresa de tres municipios del departamento de Cundinamarca, y un municipio del departamento del Cauca, Colombia. Se encontraron residuos en una muestra del departamento del Cauca.

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia. elimeval@hotmail.com

2 jaguerrero@unal.edu.co

**Palabras clave:** N-metilcarbamatos, fresa, cromatografía de permeación por geles, HPLC.

## ABSTRACT

A multiresidue method for analysis of five N-methylcarbamate pesticides (N-MCs) and four of their metabolites in strawberry was validated and implemented. Pesticide residues were extracted from strawberry samples with ethyl acetate and the extracts were cleaned by gel permeation chromatography (GPC) on 3% crosslinked styrene divinylbenzene polymer packed in a glass column of 20 cm x 10 mm i.d. and ethyl acetate ciclohexane (1:1) as solvent elution at a flow rate of 1 mL/min before injection in the chromatograph. The first 7 mL were discarded to remove matrix interferences. The fraction between 7 and 22 mL where the N-methylcarbamate pesticides and their metabolites are present, was collected. Final determination was carried out by HPLC with post-column derivatization and fluorescence detection in a C-18 column of 25 cm x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m with a gradient of acetonitrile-methanol-water. The clean up procedure demonstrated that the method is specific, selective, linear over a concentration range from 0.11 to 2.31 mg/kg, sensible enough with limit of detection and quantification between from 0.011 to 0.021 mg/kg and from 0.021 to 0.075 mg/kg respectively, as well as precise and accurate with recoveries between 80 - 110%. The validated method was used to determine N-MCs residues and their metabolites in strawberry samples in three Cundinamarca counties and one Cauca county, Colombia. Resi-

dues were detected in one Cauca county sample.

**Key words:** N-methylcarbamates, strawberry, gel permeation chromatography, HPLC.

## RESUMO

Um método multi-resíduo para a determinação de cinco pesticidas derivados de N-metil carbamatos (N-MCs) e quatro de seus metabólitos em morangos foi validado e implementado. A extração dos resíduos de pesticidas foi realizada com acetato de etila e a limpeza foi realizada por cromatografia de permeação em gel (CPG) utilizando como fase estacionária um polímero de estireno divinilbenzeno com 3% de entrecruzamento, empacotado em uma coluna de vidro de 20 cm x 10 mm d.i., e solvente de eluição composto por acetato de etila : ciclohexano (1:1) em fluxo de 1 mL/min, antes da injeção no cromatógrafo. Os primeiros 7 mL foram descartados para eliminação de interferentes da matriz, nas frações de 7 a 22 mL estavam presentes os N-metil carbamatos e seus metabolitos. A determinação final foi realizada por HPLC com derivatização pós-coluna e detecção por fluorescência usando uma coluna C-18 de 25 c x 4,6 mm d.i., 5 $\mu$ m, e um gradiente de eluição composto por acetonitrila, metanol e água. Com a limpeza realizada foi possível mostrar que o método é específico, seletivo, linear no intervalo de concentrações de 0.12 a 2.31 mg/kg, suficientemente sensível com limites de detecção e quantificação entre 0.011 - 0.021 mg/kg e 0.021 - 0.075 mg/kg respectivamente, preciso e exato com recuperação entre 80 e 110%. O método validado foi utilizado para determinar

residuos de N-MCs e seus metabólitos em amostrado de Cauca, Colombia. Resíduos foram encontrados em uma amostra do estado de Cauca.

**Palavras-chave:** N-metil carbamatos, morango, cromatografia de permeación em gel, HPLC.

## INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la agricultura con el fin de controlar plagas y evitar pérdidas en los cultivos; infortunadamente este tratamiento trae como consecuencia la posibilidad de encontrar residuos en los alimentos. Los seres humanos pueden estar expuestos a dichas sustancias al alimentarse, y por tanto es importante controlar los tratamientos fitosanitarios con el fin de garantizar que los residuos de agroquímicos estén en la menor concentración posible o que no se encuentren en los alimentos para que no haya ningún riesgo para la salud del consumidor.

Desde su introducción comercial, los N-metilcarbamatos han llegado a ser usados ampliamente a nivel mundial como sustitutos de compuestos organoclorados debido a su alta efectividad y su bajo potencial de bioacumulación. Como consecuencia, constituyen una clase de compuestos muy usados en la agricultura para combatir un gran número de pestes en una amplia variedad de cultivos, por lo que sus residuos pueden ser encontrados en frutas y vegetales (1). Ellos, junto con los organofosforados, actúan como inhibidores de la acetil colinesterasa; por este motivo están en la lista de prioridad de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) (2), e inclusive el

N-metilcarbamato aldicarb hace parte de la llamada docena sucia.

Por otra parte, para supervisar la seguridad de las provisiones alimenticias, las agencias gubernamentales han establecido los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos (LMR) y ejecutan programas de seguimiento de dichos residuos (1). Colombia ha establecido sus LMR basándose en el Codex Alimentarius (3). La integridad y efectividad de esta vigilancia dependen de la utilización de metodologías confiables, reproducibles, y de los sistemas de gestión de calidad de los laboratorios implicados en ellas (4-5).

Las técnicas de limpieza más comúnmente empleadas para extractos con este tipo de plaguicidas son la partición líquido-líquido, limpieza en columna o extracción en fase sólida. Muchos métodos requieren combinación de estas (6-8). También se ha empleado con menor frecuencia la cromatografía de permeación por geles (CPG) aunque principalmente se ha utilizado en la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados (9). Con esta técnica es posible eliminar interferentes de alto peso molecular, tales como clorofilas, colorantes, carotenoides utilizando una fase estacionaria del tamaño adecuado y un solvente o mezcla de solventes orgánicos que permitan la elución de los plaguicidas de interés.

HPLC acoplado a sistemas con reacciones pos-columna y seguidos por detección de fluorescencia hacen los métodos más específicos y selectivos logrando realizar determinaciones a muy bajos niveles de concentración (7). Este es el caso

de los N-metil carbamatos, los cuales se separan cromatográficamente por HPLC, y posteriormente en el sistema de reacción pos-columna los convierte en derivados fluorescentes con alta sensibilidad y especificidad (10-11). Algunos ensayos emplean igualmente HPLC como técnica de separación, acoplada a un espectrómetro selectivo de masas con ionización química a presión atmosférica (HPLC-APCI-MS) (12). También algunos estudios han usado el detector ultravioleta, pero este es poco selectivo en las longitudes de onda de absorción de los N-metilcarbamatos y menos sensible para determinar este tipo de compuestos (6).

En este trabajo se desarrolló un método para determinar N-metilcarbamatos y sus metabolitos de degradación en fresa, en el que se emplearon tiempos de análisis cortos, solventes menos tóxicos y en menor cantidad que los usados en metodologías convencionales. Como método de limpieza se empleó cromatografía de permeación por gel, el cual presenta la ventaja de separar los interferentes de la muestra de los analitos de interés con base en su dimensión molecular; no hay pérdida de muestra ya que no existe interacción con la fase estacionaria y no hay desactivación de la columna pues en ella no se acumulan impurezas por fenómenos químicos de retención. Finalmente se empleó un método de análisis suficientemente sensible y selectivo que generó resultados confiables y reproducibles, permitiendo determinar residuos de N-metilcarbamatos en muestras de fresa de cuatro municipios de Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos y estándares

Los estándares de plaguicidas usados fueron aldicarb, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona, oxamil, metomil, 3-hidroxicarbonfuran, 3-cetocarbonfuran, carbonfuran y carbaril, con pureza del 97 al 99,5% (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Alemania). Se empleó acetato de etilo grado residuos, metanol, ciclohexano y acetonitrilo grado HPLC, bicarbonato de sodio grado analítico y sulfato de sodio anhídrico grado residuo (J. T. Baker). El agua para el sistema de elución se produjo utilizando un sistema de purificación Milli Q (Millipore). Todos los solventes fueron pasados a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  antes de su uso. El o-fataldehido (OPA), el dimetil-2-mercaptopetilamina (tioflúor) y el reactivo de hidrólisis, hidróxido de sodio, fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). El OPA se preparó diariamente disolviendo 20 mg de o-fataldehído en 2,0 mL de metanol; adicionando 0,4 g de tioflúor en 10 mL de una solución de borato de sodio 0,05 M. Estas soluciones se transfirieron a 180 mL de una solución de borato de sodio 0,05 M. Se preparó hidróxido de sodio 0,05 M y las dos soluciones se sometieron independientemente a ultrasonido durante 15 minutos.

Las soluciones patrón y soluciones de trabajo se prepararon en metanol en concentraciones aproximadas de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 0,11-2,17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, y se almacenaron en el refrigerador a -20 °C.

### Instrumentación

En el proceso de extracción se empleó un homogeneizador Stephan 2010, un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax

T25 (IKA), una licuadora industrial (Waring), y en el proceso de limpieza se utilizó un cromatógrafo de permeación por gel de Redement Bt, modelo KL-SX-3, equipado con una columna de vidrio de 20 cm x 10 mm D.I. como fase estacionaria se usó un gel Biobeads S-X3, y como fase móvil se empleó una mezcla de acetato de etilo:ciclohexano (1:1) con un flujo de 1 mL/min.

En el análisis de N-metilcarbamatos se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia Agilent Technologies 1100 (Palo Alto, CA, USA), equipado con un detector de fluorescencia operado a longitudes de onda de excitación y emisión de 330 nm y 465 nm, respectivamente, por una bomba cuaternaria, acoplada a un sistema de reacción pos-columna PCX 5200 (Pickering Laboratorios), sistema de desgasificación con helio, válvula de inyección manual Rheodyne de seis puertos con loop de 20  $\mu$ L. La columna analítica empleada fue una C-18, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, con una pre-columna C-18 (Pickering Laboratories). La temperatura de la columna cromatográfica fue de 42 °C. La unidad de reacción pos-columna constó de dos bombas de reactivos (la solución de hidrólisis y derivatización fueron bombeadas a un flujo

de 0,3 mL/min durante la corrida cromatográfica, la temperatura de hidrólisis se generó a 100 °C y la de derivatización a 42 °C). Se utilizó un sistema de recolección de datos HP-Chemstation.

El flujo de la fase móvil varió entre 1 y 1,2 mL/min. El perfil de elución se muestra en la tabla 1.

#### Preparación, homogeneización y fortificación de la muestra

Las muestras de fresa blanco se recolectaron en cultivos orgánicos del municipio de Cota, en el departamento de Cundinamarca, y se emplearon para desarrollar el método de extracción, limpieza y para la validación de la metodología. Se tomó 1 kg de fresa, se le retiraron los sépalos y se lavaron con agua del grifo. La fresa se introdujo en el homogeneizador Stephan durante 4 minutos (intervalos de 2 minutos), se tomaron 200 g de dicho material y se transfirieron a una licuadora industrial; la muestra se homogeneizó nuevamente por un periodo de 2 minutos (13). Se tomaron porciones analíticas de 30 g de fresa homogeneizada y se fortificaron con una mezcla de N-metilcarbamatos para obtener concentraciones en el extracto final de 0,1  $\mu$ g/mL a 2,0  $\mu$ g/mL

**Tabla 1.** Gradiente empleado para la separación de N-metilcarbamatos.

Tiempo (min)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)	Metanol (%)	Flujo (mL/min)
0,0	93,0	1,0	6,0	1,2
1,0	93,0	1,0	6,0	1,2
19,0	79,6	12,4	8,0	1,2
19,5	50,0	25,0	25,0	1,0
35,0	48,0	28,0	24,0	1,0
36,0	93,0	1,0	6,0	1,2

aproximadamente. Las muestras no presentaron niveles detectables de N-metilcarbamatos antes de la fortificación.

### Extracción y limpieza

Se tomaron 30 g de fresa homogeneizada y fortificada en una probeta de extracción, se le adicionaron en orden 60 mL de acetato de etilo, 4 g de bicarbonato de sodio y 30 g de sulfato de sodio anhídrico; se sometieron a extracción en un homogeneizador de alta velocidad a 10.000 rpm durante 1,30 minutos. Se pasaron 30 mL de extracto a través de un embudo de vástago corto que contenía algodón previamente lavado con acetato de etilo y 25 g de sulfato de sodio anhídrico. El filtrado se transfirió a un balón y se evaporó a 35 °C, teniendo precaución de dejar aproximadamente 0,5 mL de solvente sin evaporar. Se realizó una transferencia cuantitativa a un balón de 2 mL, se efectuó una dilución 1:1 y se llevó a volumen con acetato de etilo. Se inyectaron 500  $\mu$ L del extracto diluido en el cromatógrafo de permeación por gel. Se recogió la fracción de N-me-

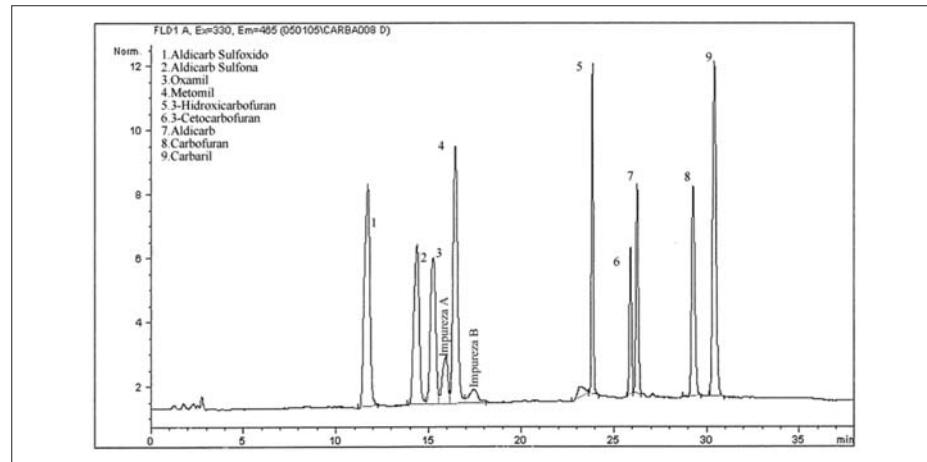
tilcarbamatos (7-22 mL) en un balón de 20 mL descartando los primeros 7 mL. Se sometió a evaporación a una temperatura de 35 °C, dejando aproximadamente 0,5 mL de la mezcla de solventes sin evaporar, se eliminó el solvente en corriente de nitrógeno y se realizó una transferencia cuantitativa a un balón de 2 mL, se llevó a volumen con metanol. El extracto limpio se pasó a través de un filtro de 0,20  $\mu$ m y finalmente se inyectaron 20  $\mu$ L en el cromatógrafo líquido.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Validación de la metodología

#### Especificidad-selectividad

Se determinó la especificidad-selectividad del método mediante la inyección en el cromatógrafo de un blanco de matriz, el cual no presentó ninguna señal significativa en el tiempo de retención de los N-metilcarbamatos de interés (14). Igualmente se preparó extracto de matriz y se fortificó a un nivel dos de la curva de cali-



**Figura 1.** Cromatograma de estándares de plaguicidas en extracto de matriz al nivel 2 de calibración (aproximadamente 0,5  $\mu$ g/mL).

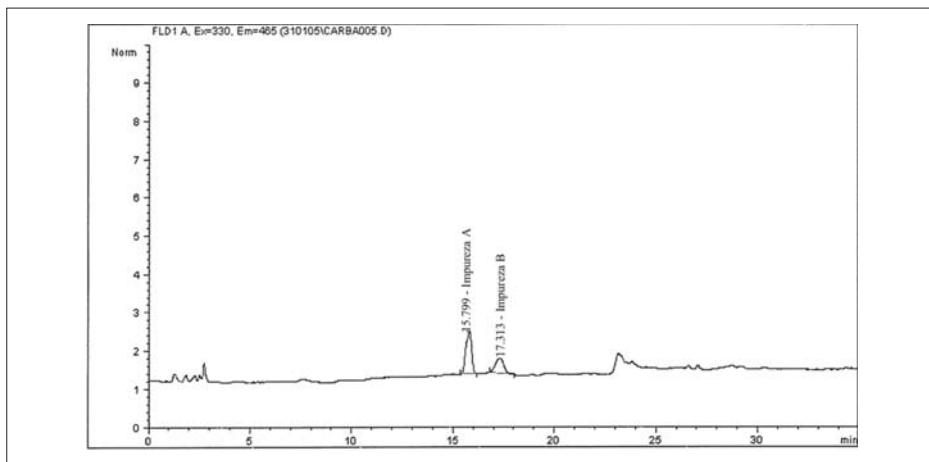


Figura 2. Cromatograma de fresa blanco.

bración, se inyectó en el cromatógrafo líquido y se determinó una separación adecuada entre señales adyacentes a los plaguicidas en estudio, con resoluciones cercanas a 1,5, tal como se aprecia en la figura 1. En la figura 2 se presenta el cromatograma del blanco de matriz.

#### *Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación*

La linealidad se evaluó a cinco niveles de concentración y tres réplicas de cada uno, la respuesta del detector fue lineal en el rango de concentraciones estudiado de 0,1 a 2,0  $\mu\text{g/mL}$  y los coeficientes de correlación para los N-metilcarbamatos estuvieron entre 0,994 y 0,998, tal como lo muestra la tabla 2. Se encontró que para todos los compuestos los interceptos son estadísticamente iguales a cero, las pendientes estadísticamente diferentes de cero, correlación y regresión significativa y linealidad con una confiabilidad del 95 %. Los límites de detección y cuantificación se evaluaron teniendo en cuenta 3 y 10 veces el ruido de la matriz blanco al

tiempo de retención de cada analito (15). La sensibilidad de estos compuestos es tal que pueden ser detectados entre 0,011 y 0,021 mg/kg, y cuantificados entre 0,021 y 0,075 mg/kg. Estos valores están por debajo de los límites máximos de residuos basados en el Codex Alimentarius; por tanto se cumplen los requerimientos para hacer un seguimiento de estos plaguicidas con esta metodología.

Tabla 2. Linealidad en la determinación de N-metilcarbamatos.

Plaguicida	r
Aldicarb sulfoxido	0,997
Ldicarb sulfota	0,996
Oxamil	0,997
Metomil	0,998
3-Hidroxicarbofuran	0,998
3-Cetocarbofuran	0,996
Aldicarb	0,998
Carbofuran	0,998
Carbaril	0,994

**Tabla 3.** Tiempos de retención, límites de detección y cuantificación para los N-metilcarbamato.

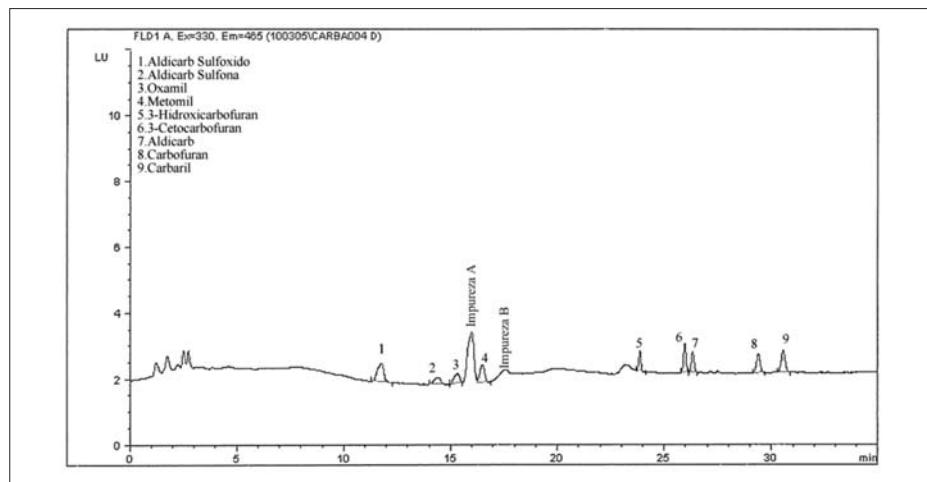
Plaguicida	tr	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Aldicarb sulfoxido	11,6	0,021	0,064
Aldicarb sulfota	14,3	0,011	0,021
Oxamil	15,1	0,011	0,032
Metomil	16,3	0,021	0,064
3-Hidroxicarbofuran	23,8	0,011	0,032
3-Cetocarbofuran	25,8	0,021	0,075
Aldicarb	26,2	0,011	0,021
Carbofuran	29,2	0,011	0,043
Carbaril	30,3	0,011	0,021

La tabla 3 presenta los valores correspondientes para cada uno de los plaguicidas, los cuales se verificaron experimentalmente. La figura 3 muestra el cromatograma de matriz blanco fortificada al límite de cuantificación.

#### *Exactitud y precisión*

La precisión y la exactitud se evaluaron fortificando extracto blanco de matriz a

cinco niveles de concentración y cinco réplicas de cada uno, sometiéndolo a proceso de extracción, limpieza y determinación en HPLC. Para evaluar precisión como repetibilidad se realizaron los ensayos en períodos cortos de tiempo, y para evaluar la precisión como precisión intermedia se efectuaron los experimentos durante días diferentes. Los recuperados obtenidos se emplearon para determinar la exactitud del método.



**Figura 3.** Cromatograma de matriz blanco fortificada al límite de cuantificación.

**Tabla 4.** Exactitud por nivel para los N-metilcarbamatos y sus metabolitos en los ensayos de precisión intermedia.

Plaguicida	R (%)				
	N1	N2	N3	N4	N5
Aldicarb sulfoxido	111,13	110,61	104,68	107,07	103,61
Aldicarb sulfota	85,44	96,38	87,56	91,31	85,79
Oxamil	88,53	99,83	90,32	92,40	87,82
Metomil	81,19	93,25	89,16	91,78	86,68
3-Hidroxicarbofuran	88,92	100,39	91,70	95,51	90,55
3-Cetocarbofuran	91,15	105,96	97,57	99,89	94,91
Aldicarb	75,45	84,53	80,23	85,15	82,89
Carbofuran	88,34	98,62	90,89	94,49	88,70
Carbaril	91,66	102,19	103,44	94,05	103,55

Los recuperados obtenidos para cada plaguicida en los experimentos de precisión intermedia por nivel de calibración se muestran en la tabla 4.

Se determinó la homogeneidad en las varianzas, lo cual permitió calcular el porcentaje de recuperación y la variabilidad para cada plaguicida independientemente del nivel de concentración (16). El promedio de recuperación varió desde el

81 hasta el 107% con desviaciones estándar relativas entre 5 y 13%. Los valores que se muestran en la tabla 5 indican la precisión y exactitud del método empleado. Estos valores se encuentran dentro de los criterios establecidos en la norma para validación de métodos en análisis de residuos de plaguicidas y drogas veterinarias, es decir, entre 70 y 110% en el rango de concentración estudiado.

**Tabla 5.** Exactitud y precisión para los N-metilcarbamatos.

Plaguicida	Recuperación (%)	Coeficiente de variación (%)
Aldicarb sulfoxido	107,4	12,5
Aldicarb sulfota	89,3	8,6
Oxamil	91,8	6,1
Metomil	88,4	5,6
3-Hidroxicarbofuran	93,4	7,2
3-Cetocarbofuran	97,9	9,8
Aldicarb	81,6	6,7
Carbofuran	92,2	9,7
Carbaril	99	5,3

### Análisis de muestras

Se determinaron residuos de N-metilcarbamatos en 21 muestras de fresa recolectadas en los municipios de Facatativá, Sibaté, Guasca (departamento de Cundinamarca) y Silvia (departamento del Cauca), empleando el método descrito con anterioridad y evaluando dos controles de calidad por cada determinación. Se encontró que las muestras de Facatativá, Sibaté y Guasca no presentaron residuos detectables de estos plaguicidas, ni de sus metabolitos de degradación. Las muestras del municipio de Silvia presentaron residuos de aldicarb sulfóxido en una concentración de 0,381 mg/kg y aldicarb sulfona en una concentración de 0,164 mg/kg, para un total de 0,491 mg/kg como aldicarb. El Codex Alimentarius no establece un límite máximo de residuos para aldicarb en dicha baya, por lo que este agroquímico no debe emplearse para controlar plagas en cultivos de fresa. El cromatograma correspondiente se muestra en la figura 4.

Este trabajo se realizó bajo el sistema de gestión de calidad del Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, bajo la norma ISO17025.

### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que el método validado e implementado es adecuado para determinar residuos de N-metilcarbamatos en fresa a bajas concentraciones.

El método de limpieza por cromatografía de permeación por gel propuesto en esta investigación es adecuado y provee extractos suficientemente limpios, minimizando interferencias y facilitando su evaluación y cuantificación.

El método desarrollado para la determinación de residuos de N-metilcarbamatos en fresa es un método rápido, sensible y emplea poco volumen de

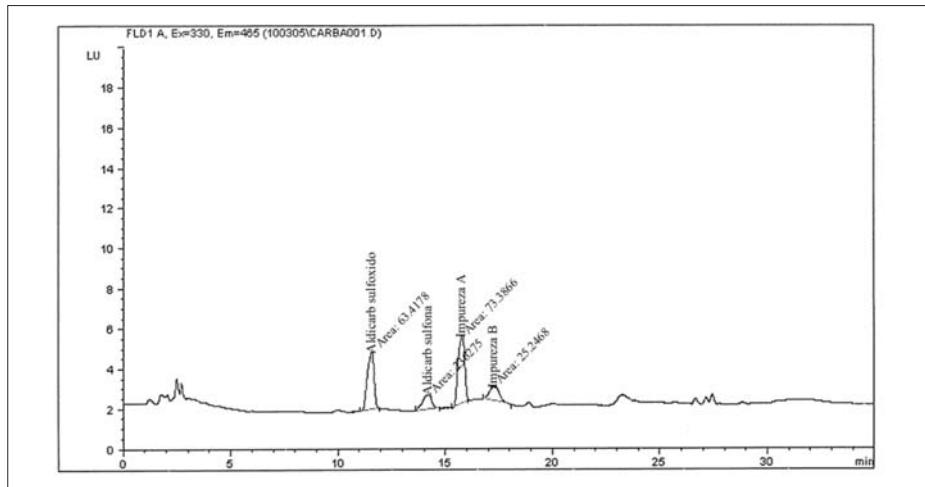


Figura 4. Cromatograma de una muestra de fresa de Silvia, Cauca.

solventes; además, el acetato de etilo es menos tóxico que otros solventes usados para extracción de N-metilcarbamatos. Esta técnica provee respuestas lineales, alta precisión, bajos límites de detección y cuantificación y porcentajes de recuperación adecuados.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, y al Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena, Austria, por su colaboración y financiación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad, A.; Moreno, M.; Pelegrí, R.; Martínez, M.; Sáez, A.; Gamón, M., and Montoya, A. Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. An analytical comparison. *J Chromatogr. A.* 1999. **833**: 3-12.
2. Sun, L., and Kee, H. Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Supercritical Fluid Extraction of Carbamate pesticides in Soil by Experimental Design Methodology. *J. Chromatogr. A.* 2003. **1014**: 165-177.
3. Hernández, J. Regulatory Harmonization and the Andean Approach. International Workshop on Crop Protection Chemistry in Latin America: Harmonized Approaches for Environmental Assessment and Regulations. IUPAC. 2005. pp. 21-25.
4. Cook, J.; Beckett, M.; Reliford, B.; Hammock, W., and Engel, M. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables Using Procedures Developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. *J. of AOAC International.* 1999. **82** (6): 1419-1435.
5. Manual de calidad. Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas, 5<sup>a</sup>. ed. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química. 2006.
6. Nunes, G.; Ribeiro, M.; Polese, L., and Barceló, D. Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-Methylcarbamate Insecticides in Vegetable Matrices by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *J Chromatogr A.* 1998. **795**: 43-51.
7. Tadeo, J.; Sánchez, C.; Pérez, R., and Fernández, M. Analysis of Herbicide Residues in Cereals, Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr A.* 2000. **882**: 175-191.
8. Holstege, D.; Scharberg, D.; Tor, E.; Hart, L., and Galey, F. A Rapid Multiresidue Screen for Organophosphorus, Organochlorine, and N-Methylcarbamate Insecticides in Plant and Animal Tissues. *J. of AOAC International.* 1994. **77** (5): 1263-1274.

9. Mcgarvey, B. High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Determination of N-Methylcarbamate Pesticides in Water, Soil, Plants and Air. *J. Chromatogr.* 1993. **642**: 89-105.
10. Sánchez, C.; Rodríguez, A., and Tadeo, J. Multiresidue Analysis of Carbamate Pesticides in Soil by Sonication-Assisted Extraction in Small Columns and Liquid Chromatography. *J. Chromatogr A.* 2003. **1007**: 85-91.
11. Caballo, A., and Luque, M. Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food. *J. Chromatogr. A.* 2003. **998**: 51-59.
12. Nunes, G.; Alonso, R.; Ribeiro, M., and Barceló, D. Determination of Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide and Aldicarb Sulfone in Some Fruits and Vegetables Using High-Performance Liquid Chromatography – Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr A.* 2000. **888**: 113-120.
13. Erazo, A. y Guerrero, J. Incertidumbre durante el procesamiento de fruta y hortalizas en el análisis de residuos de plaguicidas. *Rev. Colomb. Quím.* 2006. **35**: 163-175.
14. Ambrus, A.; Fajgelj, A. Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentrations of Organic Chemicals. En: *Principles and Practices of Method Validation*. UK: Royal Society of Chemistry. 2000. pp. 179-235.
15. Corredor, D. y Guerrero, J. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de plaguicidas en café verde por cromatografía de gases. *Rev. Colomb. Quím.* 2005. **34**: 175-188.
16. Dangond, J. y Guerrero, J. Metodología para la determinación de residuos de fungicidas benzimidazólicos en fresa y lechuga por HPLC-DAD. *Rev. Colomb. Quím.* 2006. **35**: 67-79.