

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOFURAN EN SUELOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA (CLAR-UV)

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR CARBOFURAN DETERMINATION ON SOILS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION (HPLC-UV)

VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO CARBOFURANO EM SOLOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DA ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO ULTRAVIOLETA (CLAR-UV)

Yenny A. Valencia L.^{1,2}, Sandra F. Potosí R.¹, Eliana M. Valencia Ch.¹, Isabel Bravo R.¹

Recibido: 17/02/10 – Aceptado: 12/11/10

RESUMEN

Se validó una metodología analítica que permite cuantificar residuos de carbofuran en muestras de suelo. La extracción del plaguicida desde la matriz se realizó mediante agitación mecánica empleando acetato de etilo como solvente, los extractos obtenidos se sometieron a extracción en fase sólida (EFS) utilizando cartuchos C18, finalmente, la determinación y cuantificación del carbofuran se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (CLAR-UV) a una longitud de onda de 205 nm. La metodología validada es específica y selectiva para el carbofuran, lineal en el rango desde 0,47 hasta 2,36 mgKg⁻¹, precisa con un coeficiente de variación típico (CV_{tip}) de 10,78%; exacta brindando un porcentaje de recuperación

para la metodología global (porcentaje de R) equivalente a 98,25±3,97% y sensible con límites de detección y cuantificación de 0,045 y 0,149 mgKg⁻¹, respectivamente. También se verificó la robustez del método. Se analizaron dos muestras de suelo dedicados al cultivo de café, y se encontraron residuos de carbofuran durante los primeros 30 días después de su aplicación.

Palabras clave: plaguicida, N-metil-carbamatos, carbofuran, suelo, EFS, CLAR.

ABSTRACT

An analytic method was validated to quantify Carbofuran residues in soil samples. The pesticides were extracted from

¹ Departamento de Química, Universidad del Cauca. Popayán, Cauca, Colombia.

² yvalencia@unicauca.edu.co

the matrix by mechanic stirring, using ethyl acetate as a solvent. These extracts were cleaned by using cartridges C18. The determination and quantification of Carbofuran was made by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV). The wavelength was 205 nm. The validated method is specific and selective for Carbofuran, is linear in the range from 0.47 to 2.36 mg kg⁻¹, is accurate with a typical variation coefficient of 10.78%, is exact with recovering percentage (% R) equivalent to 98.25 ± 3.97% and sensitive with detection and quantification limits since 0.045 and 0.149 mg kg⁻¹ respectively. The robustness of the method was recognized. Two samples from soil of coffee cultivation were analyzed. Residues of Carbofuran were found during the first thirty days after application. Two samples of soil coffee were analyzed finding residues of carbofuran during the first thirty days after application.

Key words: pesticides, N-metilcarbamatos, Carbofuran, soil, SPE, HPLC.

RESUMO

Neste artigo validou-se uma metodologia analítica que quantifica resíduos de carbofurano em amostras de solo. Por agitação mecânica se extraíram pesticidas da matriz, utilizando acetato de etilo como solvente. Os extratos obtidos foram submetidos à extração em fase sólida (EFS) com cartuchos de C18. Em seguida, a identificação e quantificação de Carbofuran foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV). A longitude de onda foi 205 nm. A metodologia validada é específica e seletiva para carbofuran; linear no intervalo de 0,47-2,36

mg kg⁻¹, com um coeficiente de variação (C. V_{tip}) típico de 10,78%, fornecendo uma taxa de recuperação precisa da metodologia global (R%) equivalente a 98,25 ± 3,97%. Os limites de sensibilidade de detecção e quantificação são 0,045 e 0,149 mg kg⁻¹, respectivamente. Verificou-se também a robustez do método. Analisadas duas amostras de terra dedicada ao cultivo do café, se encontraram resíduos de carbofuran nos trinta primeiros dias após aplicá-lo.

Palavras-chave: pesticidas, N-metilcarbamatos, carbofuran, solo, EFS, CLAE.

INTRODUCCIÓN

El carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamatato) es un plaguicida N-metilcarbamatato (N-MC) de actividad insecticida, acaricida y nematocida de amplio espectro para el control de plagas. Está clasificado dentro del rango de toxicidad moderada a alta, es altamente tóxico por inhalación e ingestión y moderadamente tóxico por absorción dérmica, aun cuando su absorción a través de la piel es baja. Este N-MC afecta la función del sistema nervioso inhibiendo reversiblemente la acetilcolinesterasa en humanos y animales, se metaboliza en el hígado y se excreta en la orina (1, 2).

En Colombia, el carbofuran se utiliza para controlar plagas en diversos cultivos entre los que se encuentran el cafeto, la caña de azúcar, los cereales, las frutas, las hortalizas y los tubérculos (1, 2). En el departamento del Cauca usualmente se emplea en su presentación granular como Furadan® 3GR, con un contenido de ingrediente activo de 3% carbofuran. Algunos agricultores de la región aplican

diversas dosis del plaguicida comercial granular mediante aspersión del sólido alrededor de la planta, cubriendo el plaguicida con el suelo. En algunas ocasiones los agricultores en busca de mayor eficiencia en la acción del plaguicida, aplican dosis excesivas, que superan hasta cinco veces las dosis recomendadas por el fabricante. Este N-metilcarbamato es un sólido cristalino, incoloro, su solubilidad en agua es relativamente alta con respecto a otros plaguicidas, correspondiente a 320 mg/L (25 °C) y es soluble en otros solventes como acetona, acetato de etilo, acetonitrilo y benceno. Su presión de vapor es de 2,7 mPa a 33 °C y el coeficiente de partición octanol/agua es de 1,23-1,42, relativamente bajo (1).

En consideración de los efectos indeseados que puede ocasionar la aplicación continua e indiscriminada de los plaguicidas, y teniendo en cuenta que su uso hasta el momento es imprescindible para el control de las diferentes plagas, se hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan valorar estas sustancias en suelos, aguas y alimentos, y de esta forma, evaluar el impacto potencial sobre organismos que no constituyen objetivo.

Algunos investigadores han aplicado diferentes técnicas analíticas para la determinación de carbamatos, entre las cuales se encuentran la espectrofotometría UV (3), la cromatografía de gases (4) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAR) (5). Esta última desempeña un papel importante en la cuantificación de plaguicidas N-MCs debido a su labilidad térmica, razón por la cual se ha incrementado su uso. Tales técnicas se han acoplado con técnicas de extracción, como la ex-

tracción con fluidos supercríticos (EFS), la partición líquido-líquido (PLL), la extracción *soxhlet* asistida con microondas (ESAM), la agitación mecánica, entre otras, además, técnicas de limpieza, como la cromatografía en columna (CC), la extracción en fase sólida (EFS) y la cromatografía de permeación en geles (CPG), que en conjunto proporcionan una metodología eficiente para la evaluación de residuos de plaguicidas en diferentes matrices, entre las cuales se incluyen alimentos, suelos y aguas (3-10).

Actualmente existe un marcado interés en reducir la cantidad de solventes orgánicos usados en la extracción de plaguicidas, por lo cual la EFS se ha convertido en una alternativa importante debido a su eficiencia en la limpieza y la extracción (10).

En este trabajo se implementó y validó una metodología analítica que permite cuantificar residuos de carbofuran en suelos. Esta metodología incluye extracción mediante agitación mecánica, limpieza por EFS y determinación por CLAR-UV (11).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estándares y reactivos

El estándar analítico de carbofuran se obtuvo del Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania), con pureza de 98%. Se empleó acetato de etilo grado residuos, metanol y acetonitrilo grado HPLC, sulfato de sodio anhidro grado residuo y cartuchos C18. La solución patrón (500 ppm) y las soluciones de trabajo (50 ppm) de carbofuran se prepararon en metanol y se almacenaron en el refrigerador a 3-4 °C durante el tiempo de análisis. El Furadan® 3GR (carbofuran co-

mercial, presentación granular, Bayer Cropscience S.A.).

Instrumentación

En el proceso de extracción se empleó un agitador mecánico horizontal, en la etapa de limpieza se utilizó un equipo de extracción en fase sólida, empleando cartuchos C-18 y como solvente de elusión acetoni-trilo. Para el análisis de carbofuran se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HP Serie 1100), equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, detector ultravioleta de longitud de onda variable e inyector manual con volumen de inyección de 20 μL . La columna analítica empleada fue una Spherisorb ODS-2 (5 μm de tamaño de partícula, 4,6 mm x 25 cm). Como fase móvil acetoni-trilo: agua (60:40) y un flujo de 0,7 mL/min. El carbofuran se detectó a 205 nm. Se utilizó un sistema de recolección de datos HP-Chemstation.

Preparación y fortificación de la muestra

El suelo empleado para la validación de la metodología se tomó en la finca Santa Rosa de la vereda La Aurelia, municipio de Cajibío (departamento del Cauca) ubicada a 1.740 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación pluvial de 1.500 mm a 19 °C, dedicada principalmente a cultivos de cafeto y caña panelera. La muestra de suelo se caracterizó física y químicamente de acuerdo con los análisis recomendados por la EPA, siguiendo los protocolos del IGAC (12) y con base en la "Guía de agroquímica" de la Universidad del Cauca (12-14). Esta muestra de suelo corresponde a zonas de la finca exentas de N-MCs. El suelo seco y tamizado por una malla de 2 mm se for-

tificó con cantidades variables de la solución de trabajo de 50 ppm para obtener concentraciones en el extracto final entre 0,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 4,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondientes a 0,5 y 2,4 mg/Kg, teniendo en cuenta las recomendaciones de las casas comerciales.

Extracción y limpieza

La muestra seca se tamizó a través de una malla de 2 mm (nº. 10, marca ASTM), posteriormente se realizó el respectivo cuarteo para tomar una porción analítica de 12,5 g de suelo, la cual se sometió al proceso de extracción mediante agitación mecánica durante tres horas, empleando 25 mL de acetato de etilo como solvente. El extracto se pasó a través de sulfato de sodio anhidro y se concentró en un evaporador rotatorio a 35 °C hasta un volumen aproximado de 0,5 mL. Este extracto se llevó a sequedad en corriente de N_2 y se redisolvió con metanol hasta 1 mL. El extracto metanólico se sometió a EFS empleando como relleno C-18 y 17 mL de acetoni-trilo para la activación del cartucho y la elución del Carbofuran. El extracto limpio nuevamente se concentró y se llevó a sequedad, en el evaporador rotatorio y bajo corriente de N_2 respectivamente, se disolvió con metanol a 1 mL. Finalmente, se inyectaron 20 μL del extracto, previamente filtrado, en el cromatógrafo líquido.

Validación del sistema instrumental

Se llevó a cabo empleando soluciones de carbofuran preparadas en metanol. En esta etapa se evaluaron parámetros como la especificidad, selectividad, linealidad, precisión, LD y LC instrumentales ($LD = 3S_{\text{intercepto}}/m_{\text{prom}}$, $LC = 10S_{\text{intercepto}}/m_{\text{prom}}$). Estos

parámetros se analizaron mediante estadístico t de Student y el análisis de varianza (ANOVA), los resultados estadísticos se corroboraron empleando el *software* SPSS versión 11.0 (11, 15, 16).

Evaluación del efecto matriz

Para determinar el efecto de los componentes de la matriz sobre la función de calibración, se prepararon tres réplicas de la curva de calibración en solvente, tres réplicas de la misma curva de calibración en extracto de matriz blanco. Se inyectaron en el CLAR y se determinaron las respuestas para cada uno de los niveles de calibración (15, 16).

Validación de la metodología

Se llevó a cabo empleando suelo blanco y carbofuran analítico en las concentraciones seleccionadas. Se evaluaron parámetros como la especificidad, selectividad, linealidad y límites críticos como *LD* y *LC*, precisión, exactitud y robustez, y se analizaron mediante la aplicación de diferentes pruebas estadísticas como t de student, ANOVA y test de Cochran. Los resultados estadísticos se corroboraron empleando el *software* estadístico SPSS versión 11.0 (11, 15, 16).

Los *LD* y *LC* se evaluaron teniendo en cuenta 3 y 10 veces el ruido de la matriz blanco en el tiempo de retención del analito.

Análisis de carbofuran aplicado previamente en muestras de suelo bajo condiciones de campo

Se analizó una muestra de suelo dedicada al cultivo de cafeto, la cual fue obtenida en la finca Santa Bárbara, vereda Siloe, corregimiento Samanga del municipio de

Popayán (Cauca), ubicado a 1.737 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación pluvial de 1.932 mm a 19 °C, y una pendiente aproximada de 40%. El suelo fue tratado con 39 mgKg⁻¹ Furdan® 3GR, equivalente a 12 mgKg⁻¹ de carbofuran. La aplicación del plaguicida fue llevada a cabo en condiciones de campo empleando la metodología de rutina usada por los agricultores de la región, mediante aspersión alrededor del cultivo y cubrimiento del plaguicida con el suelo.

La primera muestra del suelo fue recolectada y analizada 30 días después de la aplicación y la segunda 90 días después de la aspersión. Las muestras de suelo se sometieron al proceso previamente validado, se recolectaron en la misma unidad de muestreo y dentro de los primeros 10 cm, garantizando la aleatoriedad de cada porción, obteniendo muestras compuestas de 1 kg. Las muestras se trasladaron refrigeradas a 4 °C hasta el laboratorio, se secaron a la sombra y a temperatura ambiente. Como control de calidad del método se analizó un blanco de suelo exento de carbofuran, un blanco fortificado a 2,01 µg carbofuran mL⁻¹, garantizando la homogeneidad y representatividad de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización física y química del suelo

La validación se realizó en una muestra de suelo (*Typic melanudands*) de textura francoarenosa, alto contenido de materia orgánica y acidez media, con baja densidad aparente, tal como se aprecia en la Tabla 1. Las características ácidas de este suelo permitieron mantener la estabilidad

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del suelo empleado en la validación

Parámetro*	Valor
Humedad higroscópica	16,24%
Textura	Franco arenoso
Densidad aparente: Método del cilindro	0,90 g/mL
pH	5,66
Materia orgánica	15,43%

*Textura: bouyucos; pH: relación suelo: agua (1:1); materia orgánica: Wakley Black; Densidad aparente: método del cilindro.

del plaguicida durante el proceso de validación.

Validación del sistema instrumental

El sistema instrumental empleado resultó ser selectivo al brindar una respuesta clara para el carbofuran como se evidencia en el cromatograma ilustrado en la Figura 1, lineal en el rango de 0,99 a 5,0 μg carbofuran mL^{-1} con un coeficiente de correlación de aproximadamente 0,999, preciso con un porcentaje CV entre 1,50 y 4,78% y suficientemente sensible con límites de detección y cuantificación equivalentes a 0,116 y 0,388 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, permitiendo la detección y cuantificación de residuos de carbofuran

en suelos, en el nivel de las concentraciones aplicadas sobre diversos cultivos.

Evaluación del efecto matriz

Se aplicó el método de regresión lineal estableciendo que no hay diferencia entre las respuestas en solvente y en extracto, es decir, no hay efecto inducido por la matriz (15, 16). Este resultado se corroboró mediante la aplicación de la prueba estadística test pareado, los resultados presentados en la Tabla 2 indican la ausencia de efecto matriz al obtener un valor experimental para t inferior al valor de t_{tab} con un nivel de confianza de 95% y $n-1$ grados de libertad.

Las pruebas estadísticas realizadas demostraron la ausencia de efecto matriz, por lo cual, la cuantificación del carbofu-

Tabla 2. Test pareado para la evaluación de efecto matriz

Parámetro	Valor
Grados de libertad	4
Promedio de diferencias (-d)	4,86
Desviación estándar (SD)	23,86
t_{cal}	0,45

* t_{tab} , 2,78 (nivel de confianza: 95%, $n-1$ grados de libertad).

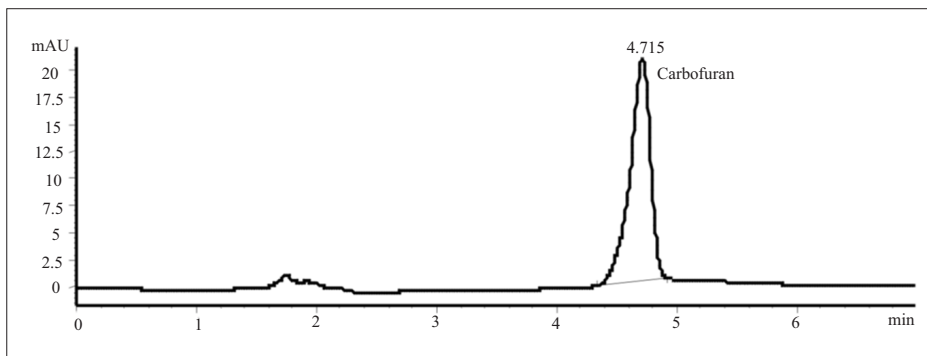


Figura 1. Cromatograma de una solución estándar de carbofuran en el nivel dos (1,5 $\mu\text{g/mL}$).

ran en muestras reales se llevó a cabo mediante la interpolación de las respuestas en curvas preparadas en solvente.

Validación de la metodología

Especificidad-selectividad

En el cromatógrafo se inyectó extracto blanco de matriz y extracto blanco de matriz fortificado a una concentración de $1,51 \mu\text{g/mL}$. Los cromatogramas resultantes se muestran en la Figura 2, donde se evidencia la ausencia de interferencias al tiempo de retención del carbofuran y una respuesta clara para el analito. Esto

permitió establecer que la metodología propuesta es específica y selectiva para el plaguicida de interés.

Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación

La linealidad se evaluó en cinco niveles de concentración y tres réplicas por nivel. La metodología propuesta es lineal en el rango de concentración entre $0,47$ y $2,36 \text{ mgKg}^{-1}$, ya que existe correlación significativa entre la concentración del analito y la respuesta brindada por el equipo, con un coeficiente de correlación de aproxi-

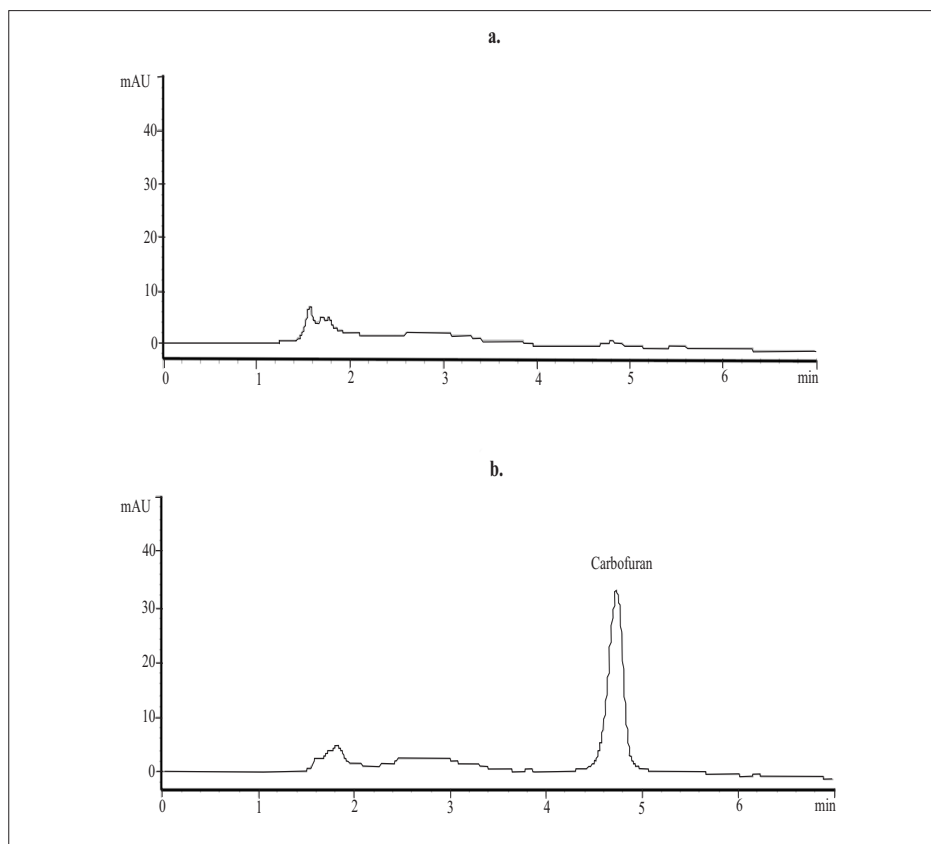


Figura 2. Cromatogramas a. extracto blanco de matriz y b. solución de carbofuran en extracto blanco de matriz en el nivel dos de calibración ($1,5 \mu\text{g/mL}$).

madamente 0,999. Tanto la pendiente como el intercepto en la curva de calibración son significativamente diferentes de cero. Además, se estableció, con una confiabilidad de 95%, que existe regresión significativa y que no hay desvío de la linealidad.

Se determinaron los límites de detección y cuantificación para la metodología, teniendo en cuenta el ruido del extracto blanco de matriz al tiempo de retención del carbofuran. Los límites de detección y cuantificación determinados experimentalmente corresponden a 0,045 y 0,171 mgKg⁻¹ respectivamente, valores que son inferiores al primer nivel de la curva de calibración.

Precisión y exactitud

Se evaluaron en cinco niveles de concentración, cinco réplicas por nivel. Se tomaron porciones analíticas de matriz exentas de carbofuran, las cuales se fortificaron para obtener el nivel correspondiente y se sometieron al proceso de extracción, limpieza y determinación mediante CLAR-UV. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad (periodos cortos de tiempo) y precisión intermedia (días diferentes), los recuperados de cada experimento se emplearon para determinar la exactitud del método. Se presenta mayor variabilidad en los resultados obtenidos bajo condiciones de precisión intermedia que en los de repetibilidad. Esto debido probablemente a la preparación de nuevas porciones analíticas fortificadas y evaluadas en diferentes curvas de calibración, así como también a posibles variaciones del instrumento y del entorno.

Mediante la aplicación del test estadístico de Cochran se estableció que existe

homogeneidad de varianzas, lo que permitió calcular la exactitud y precisión para la metodología global equivalentes al $98,25 \pm 3,97\%$ y $10,78\%$ respectivamente, valores que se encuentran dentro de los “Criterios de aceptación en la validación intra-laboratorio para el análisis de residuos de plaguicidas y drogas veterinarias” para concentraciones entre 0,4 y 2,0 mgKg⁻¹ (16).

Robustez: para este estudio se aplicó el diseño experimental de Youden-Steiner, el cual mostró que factores como el volumen de solvente en la limpieza y el flujo de la fase móvil en el CLAR deben ser controlados con el fin de obtener resultados adecuados; sin embargo, la mayoría de factores exhibieron una variabilidad baja, permitiendo establecer que la metodología es robusta bajo las condiciones de trabajo establecidas (15, 17).

Análisis de carbofuran aplicado previamente en muestras de suelo bajo condiciones de campo

Se analizaron dos muestras de suelo empleando la metodología implementada. Una de estas a los 30 días y otra a los 90 días de la aplicación. Se evaluó el desempeño de la metodología analizando un blanco y un recuperado control (98,5%), los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 3. Después de 30 días de la aplicación se encontraron residuos de carbofuran en una concentración de 2,86 mgKg⁻¹, equivalente al 24% de plaguicida aplicado inicialmente en el suelo. La diferencia entre el carbofuran aplicado y el remanente podría asociarse con pérdidas de plaguicida por procesos de lixiviación y escorrentía superficial, y también con degradación y adsorción en los coloides

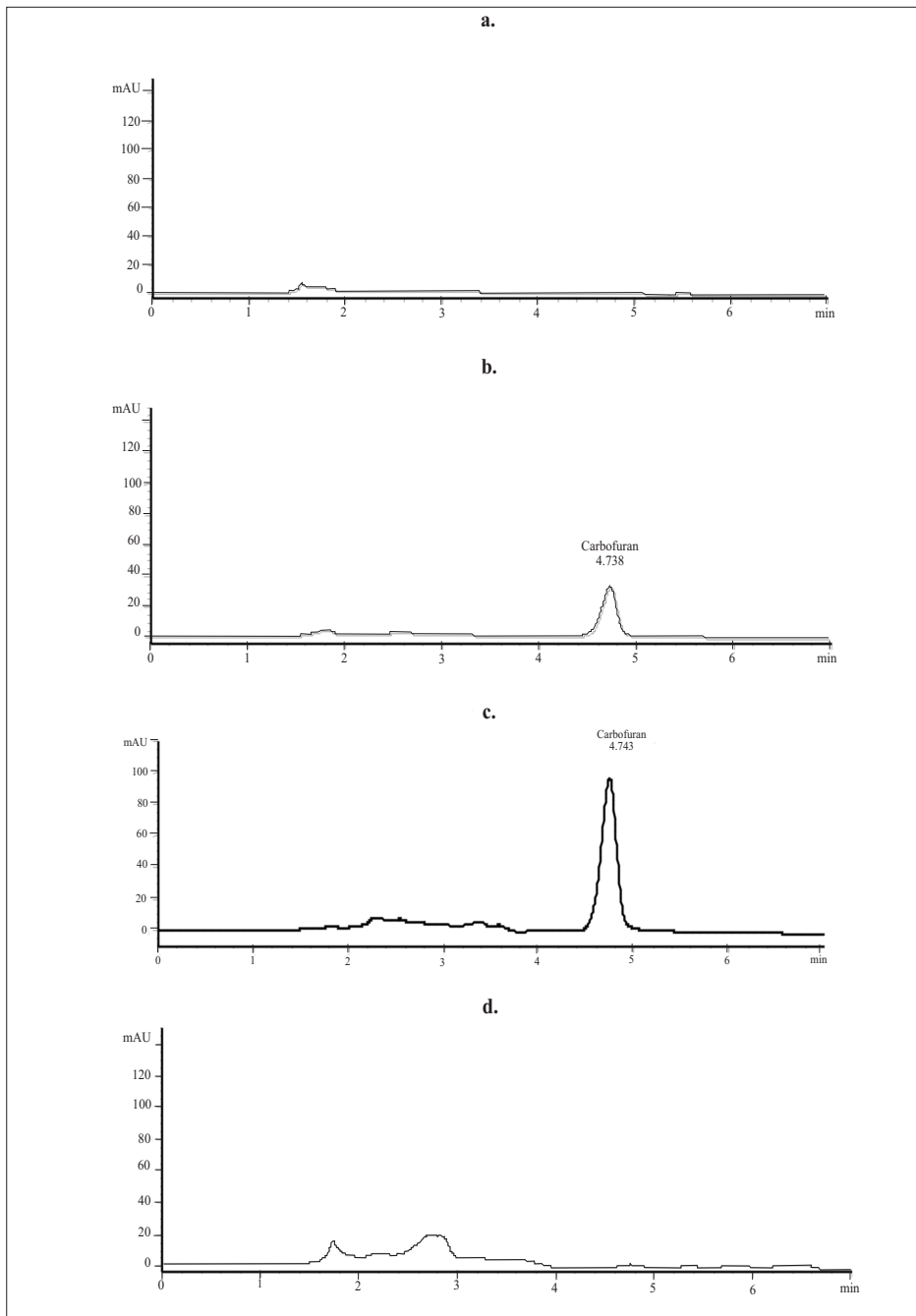


Figura 3. Cromatogramas a. extracto blanco de matriz, b. extracto del recuperado control, c. extracto muestra de suelo (30 días) y d. extracto muestra de suelo (90 días).

del suelo. Estos procesos se ven favorecidos por la topografía inclinada del sitio de muestreo y la alta solubilidad del plaguicida (13, 14).

En el análisis de la muestra de suelo tomada 90 días después de la aplicación no se detecta una señal correspondiente al carbofuran, como se evidencia en el cromatograma ilustrado en la Figura 3 (d), lo que implica que no hay plaguicida residual después de 3 meses de aplicación.

Los procesos de movilización son favorecidos por la topografía del terreno (pendiente de aproximadamente 40%), la textura arenoso-franco del suelo, la elevada solubilidad del carbofuran en agua (320 mgL^{-1} , $25 \text{ }^\circ\text{C}$) y su relativamente bajo coeficiente de partición octanol/agua (Kow) entre 1,23-1,41, factores que incrementan la probabilidad de encontrar el plaguicida en cuerpos de agua subterráneos o superficiales (1, 2, 16). Sin embargo, el relativo corto tiempo de vida media del carbofuran ($t_{1/2}$ en suelos ácidos es de aproximadamente 321 días) con respecto a otros plaguicidas hace importante realizar estudios sobre la existencia de residuos de sus metabolitos de degradación en aguas, teniendo en cuenta la relevancia y demanda de este recurso natural y el impacto que tiene sobre la economía y la salud humana y animal (1).

CONCLUSIONES

La metodología validada es específica, selectiva, robusta y suficientemente sensible con límites críticos inferiores a las cantidades de plaguicida normalmente aplicadas por los agricultores de la región. Esta metodología permite cuantificar residuos de carbofuran en suelos en

niveles comprendidos entre 0,47 y 2,36 mg Kg^{-1} de forma precisa (10,78% CV) y exacta ($98,25 \pm 3,97\%$).

La metodología propuesta fue aplicada para el análisis de residuos de carbofuran en una muestra de suelo dedicada al cultivo de cafeto, donde se encontró ausencia de carbofuran después de 90 días de la aplicación bajo condiciones de campo.

La metodología presenta como ventaja la disminución en el consumo de solventes, tiempos y costo en los análisis con respecto a metodologías anteriormente usadas, las cuales empleaban PLL y altas cantidades de solventes tóxicos como el diclorometano, acetonitrilo, entre otros (20, 21). Adicionalmente, es amigable con el medio ambiente, y evita el uso excesivo de solventes orgánicos que implican un riesgo tanto para el ambiente como para el analista.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias y a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca, por su apoyo en la financiación de este proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Evert, S. Environmental fate of carbofuran. environmental monitoring branch. Department of pesticide regulation. Sacramento. 2002. Disponible en: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/carbofuran.pdf> .
2. Debra, E. Interim registration eligibility decision (IREDD). Document

- for carbofuran. Document of EPA. 2006. pp. 1-38. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/carbofuran_ired.pdf> .
3. Nagaraja, P.; Bhaskara, B. L. Sensitive spectrophotometric assessment of carbofuran using dapsona as a new chromogenic reagent in formulations and environmental samples. *Ecletica Química*. 2006. **31** (4): 43-48.
 4. Cook, J.; Beckett, M. P.; Reliford, B.; Hammock, W.; Engel, M. Multi-residue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida department of agriculture and consumer services. *Journal of AOAC International*. 1999. **82** (6): 1419- 1435.
 5. Khin, L. Z.; Somporn, C. Optimization method of determination of carbofuran and carboxin residues in cabbages by SPE and HPLC-UV. *Chiang Mai Journal of Science*. 2007. **34** (2): 227-234.
 6. Castillo, A. E.; Subovsky, M. J.; Rodríguez, S. C.; Sosa, L. A. Efecto de un suelo con distintos usos en la movilidad de carbofuran. Resumen A-014. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 2006.
 7. EPA. Method 8318A: N-methylcarbamates by high performance liquid chromatography. 2006. pp. 1-26.
 8. McGarvey, B. D. High performance liquid chromatographic methods for the determination of N-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. *Journal of Chromatography A*. 1993. **642** (1-2): 89-105.
 9. Lei, S.; Hian, K. L. Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. *Journal of Chromatography A*. 2002. **1014**: 165-177.
 10. Nunes, G.; Ribeiro, M.; Polese, L.; 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. *Journal of Chromatography A*. 1998. **795**: 43-51.
 11. Valencia L. Y. Validación e implementación de una metodología para la determinación del plaguicida carbofuran en un suelo del departamento del Cauca dedicado a Cultivos hortícolas. Trabajo de grado. Universidad del Cauca. Popayán. 2008. pp. 26-99.
 12. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Bogotá, Imprenta Nacional de Colombia. 2006, pp. 3-22, 26-48, 51-121 y 332-333.
 13. Castillo, A.; Subovsky, M.; Sosa, L.; Nunes G. Persistencia de carbofuran en un molisol con diferentes usos. *Revista UDO Agrícola*. 2007. **7** (1): 204-208.
 14. Delle, S. A. Factors affecting sorption of organic compounds in natural sorbents/water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A Review. *Journal of Physical and*

- Chemical Reference Data*. 2001. **30** (1): 187-439.
15. Bravo, I.; Giraldo, E. Manual de prácticas de laboratorio de química agrícola: análisis de suelos. Cauca, Universidad del Cauca. 1999. pp. 23-37, 49-54.
 16. Valencia, Ch. E. Determinación de residuos N-metilcarbamatos en fresa (*Fragaria spp.*) y evaluación de la adsorción-desorción de ^{14}C -carbofuran en suelos del mismo cultivo. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2005. pp. 21-37, 50-77, 103-156.
 17. 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*. UK. 2000. pp. 138-175, 179-187, 243-248.
 18. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de métodos analíticos. Barcelona, Sociedad de Validación de Sistemas, S.L. 2001.
 19. Debra, E. Document of EPA. Interim registration eligibility decision (IRED). Document for carbofuran. 2006. pp. 1-38.
 20. Williams, I. H.; Brown, M. J. Determination of carbofuran and 3-hydroxycarbofuran residues in small fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1973. **21** (3): 399-401.
 21. Vieira, E. O.; Prates, H. T.; Cruz, I.; Ramos, M. M.; Silva, G. F. Método simplificado de determinação de resíduos de carbofuran e thiodi-carb em solo com a utilização de cromatografia líquida. *Revista Ceres*. 2001. **48** (280): 659-670.