

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Validación y comparación de los métodos analíticos de HPLC
y densitometría con TLC para la determinación de pesticidas
organofosforados en ajo (*Allium sativum*)**

Tesis presentada por el Bachiller:

Arias Casani, Erika Fabiola

ORCID: 0009-0006-3350-9286

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotechnólogo

Asesora:

Mg. Paredes Fuentes, Julitza Lindsey

ORCID: 0000-0003-2541-1802

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 12 de Noviembre del 2025

Dictamen: 014385-C-EPIB-2025

Visto el borrador del expediente 014385, presentado por:

2017220402 - ARIAS CASANI ERIKA FABIOLA

Titulado:

**VALIDACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS DE HPLC Y DENSITOMETRÍA
CON TLC PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN AJO (ALLIUM
SATIVUM)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**44327250 - MEDINA PEREZ JEANETH MARISOL
DICTAMINADOR**



**45482246 - ORTIZ ROMERO DERLY DAVID
DICTAMINADOR**



**72172854 - FLORES CALLA SUSAN SOFIA
DICTAMINADOR**



Validación y comparación de los métodos analíticos de HPLC y densitometría con TLC para la determinación de pesticidas organofosforados en ajo (*Allium sativum*)

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

3%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

1%

2

d2e1qxpsswcpgz.cloudfront.net

Fuente de Internet

1%

3

repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

1%

4

repositorio.concytec.gob.pe

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi formación superior hasta llevar a cabo mi titulación como Ingeniera Biotecnóloga.

Dedico todo mi esfuerzo a mis padres y mis abuelitos que me acompañaron en todo en este proceso, ellos son mi motor y motivo para seguir superándome.



AGRADECIMIENTOS

Agradecer primeramente a Dios y al Universo por haberme ayudado en todo el proceso que he venido llevando a cabo para lograr mi tan ansiado título como Ingeniera Biotecnóloga.

Agradecer al Dr. José Villanueva Salas; por haberme permitido ingresar como tesista al “Laboratorio Proyecto Mercurio”.

Agradecer a la Dra. Julitza Paredes Fuentes y a mis dictaminadores por el tiempo brindado para aprobar mi proyecto y borrador de tesis.

Agradecer al Dr. Luis Alberto Paredes; persona fundamental que me brindó su asesoría permanente para ser una gran persona a nivel espiritual, emocional y profesional.

Agradecer a mi mamá por su amor y paciencia incondicional, a mi papá por su esfuerzo y respaldo económico. A mi hermana y a mi Catalina, por su apoyo emocional. A toda mi familia y en especial a mis abuelitos, los cuales son una pieza fundamental en mi vida.

Así mismo, también agradecer a cada una de mis amistades que formaron parte de este proceso.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

El clorpirifos es un pesticida organofosforado de alta toxicidad, empleado para erradicar plagas en diversos cultivos y su presencia en alimentos de consumo humano como apio, cebolla, piña y ají amarillo hace necesario el empleo de métodos que sean factibles para su cuantificación. Para tal objetivo, se evaluaron y compararon dos métodos para la cuantificación de clorpirifos en bulbos de ajo mediante densitometría con TLC y HPLC, para ello se emplearon soluciones estándar de clorpirifos y se realizaron extracciones con *n*-hexano y una posterior purificación con florisil para minimizar interferencias de matriz. En cuanto a la validación de cada método se llevó a cabo bajo las directrices de la AOAC, evaluando parámetros como linealidad, precisión intermedia, repetibilidad, selectividad, límite de detección y cuantificación, así como exactitud. Ambos métodos mostraron un buen ajuste lineal con un *R* mayor a 0.999, sin diferencias significativas con un valor *P* de 0.1014, en cuanto a la selectividad por ambos métodos se logró distinguir el clorpirifos de su producto de degradación 2,3,5-tricloropiridina con picos definidos y diferencias notorias en el tiempo y factor de retención. Respecto a los parámetros del límite de detección y cuantificación, los valores de LOD y LOQ para la técnica de densitometría con TLC fueron de 2.9843 mg L⁻¹ y 5.0510 mg L⁻¹ respectivamente, mientras que el método de HPLC presentó valores de 0.0415 mg L⁻¹ para LOD y 0.0578 mg L⁻¹ para LOQ. En cuanto a la comparación de la precisión intermedia, el valor *P* fue de 0.0381 y 0.0297 para el parámetro de repetibilidad, lo cual indica que existieron diferencias significativas entre los métodos. Así mismo, en la evaluación del parámetro de exactitud, también existieron diferencias significativas donde el valor *P* fue de 0.0070 para la comparación de ambas metodologías, lo que evidencia que ambos métodos son exactos pero cada uno responde a las características propias de cada método. No obstante, el HPLC demostró mayor sensibilidad ya que detectó trazas de clorpirifos en las muestras de ajo de mercados de la ciudad de Arequipa permitiendo cuantificar concentraciones de clorpirifos que oscilaban entre 0.4084 y 3.9357 mg L⁻¹, mientras que por la técnica de densitometría con TLC no se logró cuantificar debido al límite de cuantificación el cual fue 5.0510 mg L⁻¹. Por ende, ambos métodos respondieron a los valores normados por la AOAC, en donde el HPLC ofreció una mayor sensibilidad y precisión, mientras que la técnica de densitometría con TLC resulta una opción práctica y económica para monitoreos rápidos en zonas agrícolas con niveles elevados de contaminación del pesticida.

Palabras clave: HPLC, densitometría con TLC, clorpirifos.

ABSTRACT

Chlorpyrifos is a highly toxic organophosphate pesticide used to eradicate pests in various crops, and its presence in food products intended for human consumption, such as celery, onion, pineapple, and yellow chili, highlights the need for reliable methods for its quantification. For this purpose, two analytical methods for the quantification of chlorpyrifos in garlic bulbs were evaluated and compared: TLC-densitometry and HPLC. Standard chlorpyrifos solutions were prepared, and extractions were performed using n-hexane followed by purification with florisil to minimize matrix interferences. The validation of each method was carried out in accordance with AOAC guidelines, assessing parameters such as linearity, intermediate precision, repeatability, selectivity, detection and quantification limits, and accuracy. Both methods showed a good linear fit with an R greater than 0.999, with no significant differences and a *P*-value of 0.1014. Regarding selectivity, both methods successfully distinguished chlorpyrifos from its degradation product, 2,3,5-trichloropyridine, showing well-defined peaks and noticeable differences in retention time and factor. For the detection and quantification limits, the TLC densitometric technique presented LOD and LOQ values of 2.9843 mg L⁻¹ and 5.0510 mg·L⁻¹, respectively, whereas the HPLC method showed lower values of 0.0415 mg L⁻¹ (LOD) and 0.0578 mg L⁻¹ (LOQ). In the comparison of intermediate precision, the *P*-value was 0.0381, and for repeatability 0.0297, indicating significant differences between the two methods. Likewise, for the accuracy parameter, there were also significant differences where the *P* value was 0.0070 for the comparison of both methodologies, demonstrating that both methods are accurate but respond differently according to their analytical characteristics. However, HPLC demonstrated higher sensitivity, detecting traces of chlorpyrifos in garlic samples collected from markets in the city of Arequipa, with concentrations ranging from 0.4084 to 3.9357 mg L⁻¹. In contrast, the TLC densitometric technique was unable to quantify the pesticide due to its higher quantification limit (5.0510 mg L⁻¹). Therefore, both methods complied with AOAC standards: HPLC offered superior sensitivity and precision, whereas TLC densitometry proved to be a practical and economical option for rapid monitoring in agricultural areas with elevated levels of pesticide contamination.

Keywords: HPLC, TLC-densitometry, chlorpyrifos.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1. Pesticidas organofosforados	6
1.1.1. Características generales	7
1.1.2. Clorpirifos	7
1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifos	7
1.1.2.1.1. Propiedades químicas	7
1.1.2.1.1. Propiedades físicas	8
1.1.2.2. Mecanismo de acción.....	8
1.1.2.3. Persistencia del clorpirifos en el medio ambiente y en cultivos	8
1.1.2.4. Marco legal del límite máximo de residuos de clorpirifos en Perú	10
1.2. Metodologías para la cuantificación de clorpirifos	11
1.2.1. Tipos de cromatografía	11
1.2.1.1. Cromatografía de fase normal.....	11
1.2.1.2. Cromatografía de fase reversa.....	11
1.2.1.3. Cromatografía de par iónico	12
1.2.2. Mecanismos de separación en cromatografía	12
1.2.2.1. Adsorción	12
1.2.2.2. Absorción o partición.....	12
1.2.2.3. Intercambio iónico	12
1.2.3. Adsorbentes empleados en cromatografía	13
1.2.3.1. Sílica.....	13
1.2.3.2. Florisil	13

1.2.3.3. C18	13
1.3. Cromatografía en capa fina (TLC)	13
1.3.1. Cuantificación mediante densitometría con TLC	13
1.3.2. Fundamentos de la técnica cromatografía en capa fina	14
1.3.2.1. Factor de retención	14
1.3.2.2. Aplicación de la muestra	14
1.3.2.3. Cámaras de desarrollo y revelado	14
1.3.2.4. Derivatización post cromatográfica	15
1.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	15
1.4.1. Componentes básicos del HPLC	15
1.4.1.1. Bombas impulsadoras	15
1.4.1.2. Sistema de almacenamiento de fase móvil	15
1.4.1.3. Inyectores	15
1.4.1.4. Detectores	16
1.4.1.5. Columna	16
1.4.1.6. Sistema de control y procesamiento de datos	16
1.4.2. Métodos de elución en HPLC	16
1.4.2.1. Elución isocrática	16
1.4.2.2. Elución en gradiente	16
1.5. Método analítico	17
1.5.1. Validación de un método analítico	17
1.5.2. Parámetros analíticos	17
1.5.2.1. Linealidad	17
1.5.2.2. Precisión	17
1.5.2.3. Límite de detección	17
1.5.2.4. Límite de cuantificación	17
1.5.2.5. Selectividad	18
1.5.2.6. Exactitud	18
1.5.2.7. Reproducibilidad y robustez	18
1.6. Cultivo de ajo en Perú	18
1.6.1. Cultivo de ajo en Arequipa y su exportación	18
CAPÍTULO II	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Campo de verificación	20

2.1.1. Ubicación espacial	20
2.1.2. Ubicación temporal.....	20
2.1.3. Ubicación de estudio.....	20
2.2. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación	20
2.2.1. Materiales y reactivos	20
2.2.2. Proceso de extracción de clorpirifos y posterior purificación empleando como matriz bulbos de ajo	22
2.2.2.1. Extracción de clorpirifos en bulbos de ajo.....	22
2.2.2.2. Procedimiento de <i>clean up</i> de los extractos	23
2.2.3. Validación de la técnica de densitometría con TLC para la determinación de clorpirifos.....	24
2.2.3.1. Linealidad.....	24
2.2.3.2. Precisión de repetibilidad.....	25
2.2.3.3. Precisión intermedia.....	25
2.2.3.4. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	25
2.2.3.5. Selectividad.....	26
2.2.3.6. Exactitud	26
2.2.3.6.1. Estándar de clorpirifos.....	26
2.2.3.6.2. Muestra de ajo fortificada con clorpirifos	27
2.2.3.6.3. Matriz de ajo no fortificada (blanco)	27
2.2.3.7. Reproducibilidad y robustez	27
2.2.4. Validación de cromatografía líquida de alta afinidad (HPLC) para la determinación de clorpirifos en ajo	27
2.2.4.1. Linealidad	28
2.2.4.2. Precisión de repetibilidad.....	28
2.2.4.3. Precisión intermedia.....	28
2.2.4.4. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	28
2.2.4.5. Selectividad.....	29
2.2.4.6. Exactitud	29
2.2.4.6.1. Estándar de clorpirifos.....	29
2.2.4.6.2. Muestra de ajo fortificada con clorpirifos	29
2.2.4.6.3. Matriz de ajo no fortificada (blanco)	29
2.2.5. Recolección de muestras.....	30

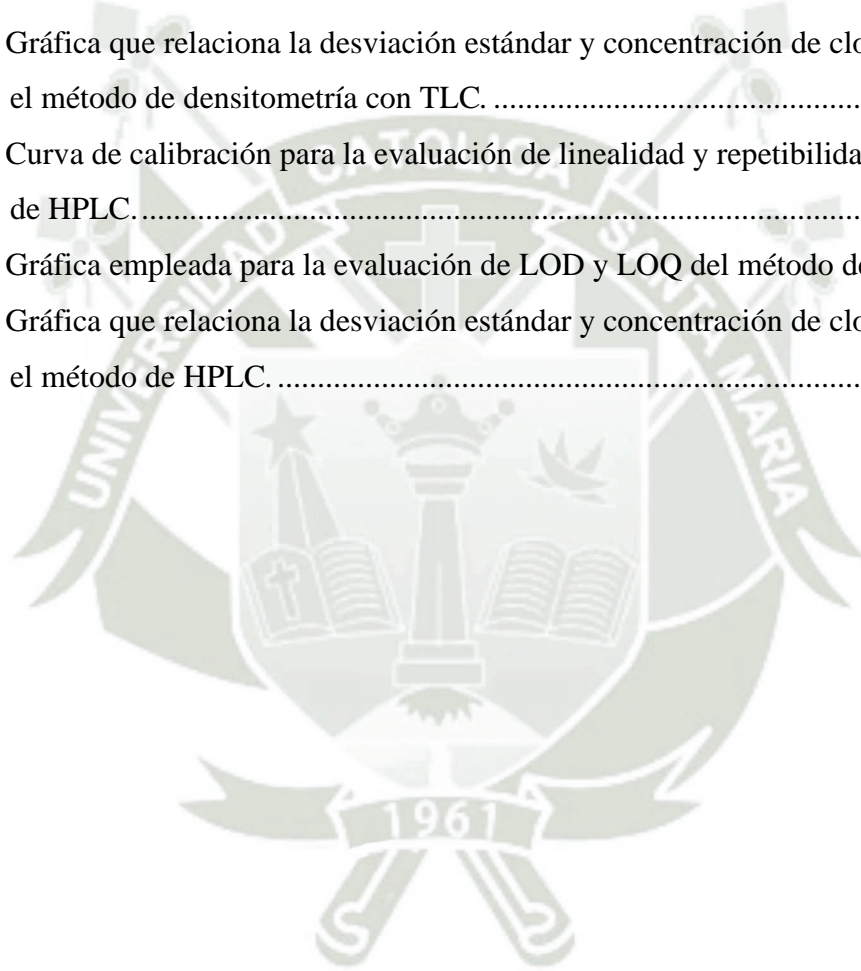
2.2.6. Determinación de clorpirifos en las muestras de ajo recolectadas y su análisis por el método de HPLC y la técnica de densitometría con TLC	30
2.3. Estrategia y recolección de datos	30
2.3.1. Análisis estadístico	31
CAPÍTULO III	32
3. RESULTADOS	33
3.1. Procedimiento de extracción y <i>clean up</i>	33
3.2. Validación del método de densitometría con TLC	33
3.2.1. Linealidad	34
3.2.2. Precisión de repetibilidad.....	35
3.2.3. Precisión intermedia	36
3.2.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	37
3.2.5. Selectividad.....	38
3.2.6. Exactitud	38
3.3. Validación del método HPLC	40
3.3.1. Linealidad	40
3.3.2. Precisión de repetibilidad.....	42
3.3.3. Precisión intermedia	42
3.3.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	43
3.3.5. Selectividad.....	44
3.3.6. Exactitud	44
3.4. Tratamiento de muestras.....	45
3.4.1. Recolección de muestras de ajo en mercados de la ciudad de Arequipa.....	45
3.4.2. Determinación de clorpirifos en ajo.....	46
3.5. Análisis estadístico para comparar ambas metodologías	47
3.5.1. Comparación del parámetro de linealidad	47
3.5.2. Comparación del parámetro de precisión de repetibilidad	48
3.5.3. Comparación del parámetro de precisión intermedia	49
3.5.4. Comparación del parámetro de exactitud	50
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de mercados muestreados en la ciudad de Arequipa.....	30
Tabla 2. Áreas correspondientes al parámetro de linealidad del método de densitometría con TLC.....	34
Tabla 3. Valores aceptables de CV para el parámetro de repetibilidad según la AOAC.....	36
Tabla 4. Áreas correspondientes al parámetro de precisión intermedia del método de densitometría con TLC.	36
Tabla 5. Áreas correspondientes al parámetro de exactitud del método de densitometría con TLC.....	39
Tabla 6. Valores aceptables del porcentaje de recuperación según la AOAC.	40
Tabla 7. Áreas correspondientes al parámetro de linealidad del método de HPLC.....	41
Tabla 8. Áreas correspondientes al parámetro de precisión intermedia del método de HPLC	42
Tabla 9. Áreas correspondientes al parámetro de exactitud del método de HPLC	45
Tabla 10. Concentraciones de clorpirifos en muestras de ajo mediante análisis por HPLC....	46
Tabla 11. Prueba F y t para la comparación del parámetro de linealidad en ambos métodos .	48
Tabla 12. Prueba F y t para la comparación del parámetro de precisión de repetibilidad en ambos métodos.....	49
Tabla 13. Prueba F y t para la comparación del parámetro de precisión intermedia en ambos métodos.....	50
Tabla 14. Prueba F y t para la comparación del parámetro de exactitud (recuperación del estándar clorpirifos) en ambos métodos	51
Tabla 15. Prueba F y t para la comparación del parámetro de exactitud (recuperación de ajo fortificado con estándar clorpirifos) en ambos métodos.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de clorpirifos.....	7
Figura 2. Degradación del pesticida clorpirifos en el medio ambiente.....	10
Figura 3. Curva de calibración para la evaluación de linealidad y repetibilidad de la técnica de densitometría con TLC.	35
Figura 4. Gráfica empleada para la evaluación de LOD y LOQ del método de con TLC.	37
Figura 5. Gráfica que relaciona la desviación estándar y concentración de clorpirifos para el método de densitometría con TLC.	37
Figura 6. Curva de calibración para la evaluación de linealidad y repetibilidad del método de HPLC.....	41
Figura 7. Gráfica empleada para la evaluación de LOD y LOQ del método de HPLC.....	43
Figura 8. Gráfica que relaciona la desviación estándar y concentración de clorpirifos para el método de HPLC.	44



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema del proceso de extracción de estándar clorpirifos en matriz de ajo para la validación del parámetro de exactitud en ambas metodologías.	82
Anexo 2. Esquema del proceso de extracción de clorpirifos en bulbos de ajo.	82
Anexo 3. Cromatograma estándar clorpirifos por el método de HPLC ($t_R=11.4$ min)... ..	83
Anexo 4. Visualización UV (254 nm) curva de calibración clorpirifos ($R_f=0.51$).	83
Anexo 5. Derivatización en TLC curva de calibración de clorpirifos, inmersión en reactivo $AgNO_3$ 0.12 M (140°C).	84
Anexo 6. Densitograma de la curva de calibración de clorpirifos por el método de densitometría con TLC ($R_f=0.51$).	84
Anexo 7. Evaluación del tiempo de retención del compuesto 2,3,5-tricloropiridina en HPLC ($t_R=3.8$ min).	85
Anexo 8. Cromatograma evaluación de selectividad en HPLC de clorpirifos ($t_R=11.4$ min) y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina ($t_R=3.8$ min) en matriz de ajo.	85
Anexo 9. Visualización UV (254 nm) evaluación de selectividad del clorpirifos y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina por el método de densitometría con TLC.....	86
Anexo 10. Derivatización en TLC evaluación de selectividad de clorpirifos y 2,3,5 - tricloropiridina, inmersión en reactivo $AgNO_3$ 0.12 M (140°C).....	86
Anexo 11. Densitograma del estándar clorpirifos (pico verde, $R_f= 0.51$) y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina (pico amarillo, ($R_f= 0.48$)).	87
Anexo 12. Extracción del estándar clorpirifos en cartucho florisil con sulfato de sodio anhidro.....	87
Anexo 13. Extractos recuperados por el método de extracción y <i>clean up</i> para la validación del método de exactitud.....	88
Anexo 14. Cromatograma del estándar clorpirifos 4 mg L^{-1} recuperado por el método de extracción y <i>clean up</i> ($t_R=11.4$ min, área=33853).....	88
Anexo 15. Cromatograma de la muestra de ajo fortificada con estándar clorpirifos 4 mg L^{-1} recuperada por el método de extracción y <i>clean up</i> ($t_R=11.4$ min, área=32093)... ..	89
Anexo 16. Cromatograma de la muestra de ajo fortificada recuperada por el método de extracción y <i>clean up</i> ($t_R=11.4$ min, área=1190).....	89

Anexo 17. Visualización UV (254 nm) evaluación exactitud por el método de densitometría con TLC (40 mg L ⁻¹).	90
Anexo 18. Derivatización evaluación de exactitud en TLC, inmersión en reactivo AgNO ₃ 0.12 M (140°C).	90
Anexo 19. Densitograma de la evaluación de exactitud por el método de densitometría con TLC (40 mg L ⁻¹).	91
Anexo 20. Bulbos de ajo en fresco triturado para la cuantificación de clorpirifos.	91
Anexo 21. Bulbo de ajo Napurí.	92
Anexo 22. Bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS.	92
Anexo 23. Bulbo de ajo Arequipeño.	93
Anexo 24. Bulbo de ajo Chino.	93
Anexo 25. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Napurí del mercado Acomare.	94
Anexo 26. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS del mercado Señor de Huanca.	94
Anexo 27. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS del mercado Acomare.	95
Anexo 28. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Chino del mercado Señor de Huanca.	95
Anexo 29. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Arequipeño del mercado Acomare.	96
Anexo 30. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Arequipeño del mercado Río Seco.	96
Anexo 31. Visualización UV (254 nm) bulbos de ajo muestreados en mercados de la ciudad de Arequipa por el método de densitometría con TLC.	97
Anexo 32. Muestras de ajo sembrados por el método de densitometría con TLC y derivatización con el reactivo AgNO ₃ 0.12 M (140°C).	97
Anexo 33. Densitograma de bulbos de ajo muestreados de mercados dentro de la ciudad de Arequipa por el método de densitometría con TLC.	98

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

TLC: Cromatografía en Capa Fina

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

MIDAGRI: Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria

LMR: Límite Máximo de Residuos

UV; Ultravioleta

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación



INTRODUCCIÓN

El clorpirifos, es un pesticida organofosforado usado en varios países en desarrollo debido a la toxicidad potencial que posee contra un amplio espectro de plagas en una variedad de cultivos a nivel mundial (1–4). No obstante, la exposición prolongada a dosis bajas de clorpirifos puede representar riesgos potenciales para la salud, ya que puede ingresar al cuerpo humano a través de la piel o el tracto digestivo causando daño a órganos, efectos neurológicos e incluso cáncer (3,5). También afecta la supervivencia de diversas especies, incluidos organismos acuáticos y aves, generando alteraciones significativas en los ecosistemas (6,7). En particular, el clorpirifos presenta una fuerte afinidad por las partículas del suelo y, debido a su baja solubilidad en medios acuosos dificulta su degradación en condiciones ambientales naturales (4,7), provocando su acumulación y contribuyendo a la contaminación ambiental (agua, suelo y alimentos) incluso a concentraciones muy bajas (8–11). Por ende, su uso está estrictamente regulado, lo que hace imprescindible su detección y cuantificación mediante técnicas analíticas confiables. En este contexto, se vuelve fundamental desarrollar métodos que sean altamente eficientes, precisos y accesibles para identificar compuestos organofosforados en distintas matrices (12,13). Las técnicas analíticas para detectar pesticidas organofosforados en alimentos se basan principalmente en técnicas cromatográficas como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, cromatografía de gases, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los cuales deben proporcionar alta resolución, precisión y repetibilidad de los resultados (14–18). Dependiendo las características fisicoquímicas del plaguicida y la instrumentación disponible, se puede emplear alguno de estos métodos (19). El ajo (*Allium sativum*), uno de los cultivos domesticados más antiguo (20), originario del oeste de Asia, desempeña un papel crucial en la agricultura mundial debido a sus usos culinarios y medicinales (21). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se producen casi 22 millones de toneladas métricas de ajo en todo el mundo (22). Siendo China el mayor productor y consumidor de ajo (22,23) con el 50% de área de plantación y 76% del rendimiento total a nivel mundial (21). El cultivo de ajo en la ciudad de Arequipa muestra una elevada producción entre los meses de setiembre hasta diciembre (24). Sin embargo, enfrenta pérdidas significativas postcosecha debido a la humedad, fluctuaciones de temperatura y las infestaciones de plagas tales como trips, nemátodos, roya del ajo (22,25) haciendo necesario el empleo de pesticidas ya que ayuda a erradicar y disminuir su presencia (26,27). Esto en consecuencia contribuye a la contaminación ambiental afectando a organismos no objetivo (6,15).

El método de HPLC ofrece ventajas como la separación, purificación y cuantificación del analito de interés empleando cantidades pequeñas de muestra, pero también presenta desventajas como el largo tiempo de análisis requerido y el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, que generan una contaminación secundaria (28). En cuanto al medio ambiente, los solventes pueden contaminar las aguas superficiales y subterráneas afectando la vida acuática y calidad de agua potable (29). Así también al evaporarse, contribuyen a la contaminación del aire y la atmósfera.

Por otra parte, la cromatografía en capa fina (TLC) ofrece ventajas en este aspecto, ya que emplea solventes en menor volumen (30) y la generación de residuos es menor a la del HPLC ya que no requiere columnas ni equipos complejos. El principio cualitativo de esta técnica consiste en la comparación de valores del factor de retención (R_f) obtenidos de muestras y estándares en la misma placa. Sin embargo, al acoplarse con densitometría permite una estimación semicuantitativa al medir la intensidad de las bandas, las cuales se integran y evalúan según la altura o el área del pico, donde el valor de cada área es proporcional a la concentración analizada. Puede trabajar mediante mediciones de absorbancia o fluorescencia en modo de reflectancia o transmisión, es decir se mide la cantidad UV transmitida, fluorescente o reflejada (31). Por ello se desea comparar los parámetros de validación de ambas metodologías para la determinación de clorpirifos, considerando las características propias de cada técnica, con el fin de obtener resultados confiables, precisos y exactos.

HIPÓTESIS

Dado que HPLC es un método empleado para la cuantificación de clorpirifos según la AOAC, es probable que sea comparable a la técnica de densitometría con TLC y responda a estas necesidades.



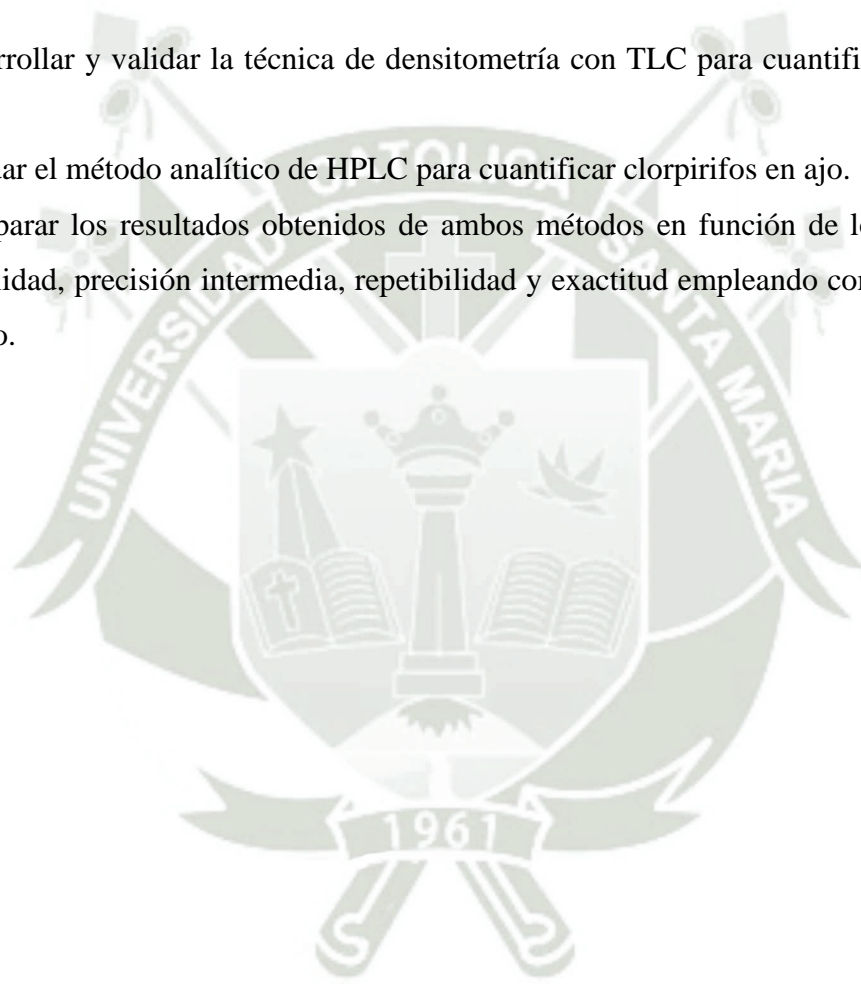
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Validar y comparar los métodos analíticos de HPLC y densitometría con TLC para la determinación del pesticida organofosforado “clorpirifos” en ajo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar y validar la técnica de densitometría con TLC para cuantificar clorpirifos en ajo.
2. Validar el método analítico de HPLC para cuantificar clorpirifos en ajo.
3. Comparar los resultados obtenidos de ambos métodos en función de los parámetros de linealidad, precisión intermedia, repetibilidad y exactitud empleando como matriz bulbos de ajo.





CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1. MARCO TEÓRICO

Los pesticidas pueden definirse como sustancias orgánicas o inorgánicas que se utilizan para mitigar o prevenir malezas, plagas, protegiendo así a las plantas de enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos y algas (32,33). En el ámbito agrícola, estos productos químicos mejoran la eficiencia y productividad de los cultivos (34,35). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el uso de pesticidas en todo el mundo alcanzó aproximadamente 4,1 millones de toneladas en 2019, lo cual evidenció un aumento constante durante la última década (36). Sin embargo, su uso excesivo e inadecuado es uno de los principales contribuyentes a la contaminación ambiental y en consecuencia genera efectos dañinos en el ecosistema (32,34,37,38). Un estudio de Battaglin et al. (39) detectó residuos de glifosato en arroyos y ríos, lo que genera riesgos ecológicos para los organismos acuáticos. En el río Yangtsé, ubicado en una de las zonas agrícolas más productivas de China, se han detectado concentraciones elevadas de pesticidas, especialmente de los grupos organofosforados y piretroides en muestras de agua y suelo, lo que constituye un riesgo para la salud humana como para la biodiversidad (40,41). En cuanto a los efectos en el ser humano, la exposición a estos pesticidas ya sea por vía dérmica, consumo de agua o alimentos contaminados, provoca diversos problemas de salud como cáncer, alteraciones neurológicas y trastornos en la función reproductiva (19). Según su estructura química, se dividen en cuatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (6,28).

1.1. Pesticidas organofosforados

Los pesticidas organofosforados, también conocidos como ésteres de fosfato (42), son los insecticidas más utilizados a nivel mundial debido a su alta efectividad (43,44), baja persistencia (45,46) y por ser relativamente económico (15,47). Sin embargo, a pesar de su alta eficiencia para proteger a los cultivos de los insectos, su uso excesivo y descuidado puede causar daños significativos a los ecosistemas y a la salud humana incluso después de varios años de exposición. Así mismo, esta situación conduce a la superación de los Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos por el Codex Alimentarius y la Comisión Europea (13). En los seres humanos, las principales vías de contacto ante una exposición por esta clase de pesticida son por absorción dérmica (48–50), inhalación (43,51) e ingestión (9,52). En casos de intoxicación, el tratamiento incluye la administración de líquidos, oxígeno y algunos fármacos como antagonistas muscarínicos y un reactivadores de acetilcolinesterasa (11).

1.1.1. Características generales

Son compuestos orgánicos que llevan en su estructura una cadena lateral de éster de fosfato que consta de un átomo de fósforo central unido a un átomo de oxígeno conocido como oxón ($P=O$) o unido a un átomo de azufre conocido como tión ($P=S$) (9,15,42,43). Su toxicidad está determinada por el contenido de azufre y la valencia del fósforo en su estructura (10,11), desarrollando un efecto tóxico a través de la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas (53). En cuanto a la solubilidad, la mayoría de estos compuestos poseen una alta afinidad por los lípidos, lo que facilita su absorción a través de la piel (42), el sistema respiratorio y el tracto gastrointestinal (2,11,14).

1.1.2. Clorpirifos

El clorpirifos es uno de los pesticidas organofosforados ampliamente empleado a nivel mundial para el manejo de insectos en la agricultura (49). Es insoluble en agua, pero soluble en la mayoría de disolventes orgánicos. En cuanto a su estructura, la presencia del grupo cloro aumenta la liposolubilidad del compuesto y prolonga su vida media en el organismo (2,11).

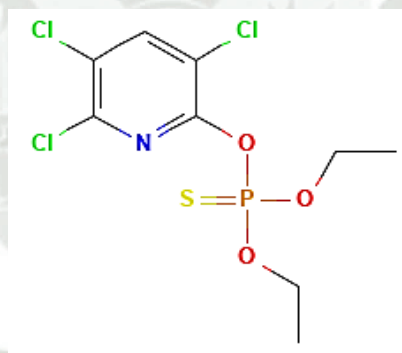


Figura 1. Estructura química de clorpirifos.

* Pubchem (54).

En Perú, el clorpirifos se ha usado por más de 40 años para el control de plagas en cultivos como el maíz, maní, alfalfa entre otros. Sin embargo, debido a su alta bioacumulación en aguas superficiales y subterráneas, así como los riesgos que representa para la salud humana, se declaró prohibido su venta y uso a partir del año 2023 (55).

1.1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifos

Según la EPA, el clorpirifos presenta las siguientes propiedades fisicoquímicas (54)

1.1.2.1.1. Propiedades químicas:

- Fórmula molecular: $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

- Peso molecular: 350.6 g/mol
- Estado físico: Sólido cristalino e incoloro
- Olor: Olor suave similar al de los pesticidas organofosforados

1.1.2.1.2. Propiedades físicas:

- Solubilidad en agua: 1.66 mg/L a una temperatura de 25°C
- Solubilidad en disolventes orgánicos: Alta en disolventes como acetona, metanol, etanol, cloroformo.
- Log K_{OA} (coeficiente de partición octanol agua): 4.96
- Log K_{OC} (coeficiente de adsorción en suelo): 3.70
- Presión de vapor: - 44 mmHg
- Punto de fusión: 42°C

1.1.2.2. Mecanismo de acción

El clorpirifos es una toxina de clase II, moderadamente tóxica según la EPA, con una dosis letal media oral (LD_{50}) que oscila entre 50–500 mg/kg (11). La intoxicación por clorpirifos implica la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (2) mediante la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina presente en su estructura. Esta enzima tiene como función principal la degradación de la acetilcolina y cuando se encuentra inhibida, provoca una acumulación excesiva de acetilcolina en la sinapsis, lo que genera efectos neurotóxicos en el organismo (53) afectando directamente las funciones normales del sistema nervioso central y periférico (28,56) lo cual desencadena síntomas como náuseas, dolor de cabeza, desorientación, pérdida de memoria y síndrome de fatiga crónica (50). Ante una exposición crónica y prolongada, los efectos tóxicos pueden desencadenar enfermedades neurológicas como Alzheimer y Parkinson o también cáncer de próstata y linfoma de Hodgkin (10,56).

1.1.2.3. Persistencia del clorpirifos en el medio ambiente y en cultivos

Los pesticidas organofosforados son persistentes en el medio ambiente en condiciones ácidas, elevada materia orgánica en el suelo, luz reducida y temperaturas por debajo de los 10°C. En los suelos, pueden permanecer mediante la aplicación directa del pesticida, donde generalmente permanece en formulaciones sólidas y de forma indirecta mediante el lavado de las plantas tratadas a las cuales se le aplicó el pesticida o por caída accidental durante la pulverización terrestre y aérea de los cultivos agrícolas (57,58).

Puede permanecer biológicamente activo por un periodo que oscila entre 20 días hasta tres meses dependiendo las condiciones ambientales (59). En condiciones reales de aplicación en campo, la persistencia del clorpirifos sobre la superficie del suelo suele ser limitada, con una duración aproximada entre varios días y hasta dos semanas. No obstante, cuando el compuesto se incorpora en el suelo, su actividad puede prolongarse entre uno y dos meses (60) motivo por el cual se clasifica como un pesticida de persistencia moderada (61). Entre los factores más relevantes que influyen en la degradación del clorpirifos en el suelo se encuentran las altas temperaturas (62–65), el pH elevado del suelo (66), el proceso de volatilización y una alta degradación microbiana (65). En consecuencia, la presencia prolongada de clorpirifos en el suelo conlleva a un grave riesgo de contaminación tanto de las aguas subterráneas como de las superficiales (67). Esto impacta directamente la calidad del agua potable en áreas aledañas, y de manera indirecta el suelo y la cadena alimentaria, poniendo en peligro a los humanos y ecología acuática (68).

Por otra parte, debido a su baja solubilidad en agua, el clorpirifos presenta una persistencia relativamente corta en medios acuosos. Un estudio evaluó su vida media de degradación y demostró que a una temperatura de 21°C fue de 4.8 días, mientras que a 4°C se extendió a 27 días. Estos resultados evidenciaron que la temperatura es un factor determinante en la velocidad de degradación del clorpirifos en el agua (63). En los cultivos, los pesticidas son aplicados mayormente sobre las hojas (aplicación foliar), aplicaciones al suelo o tratamiento de semillas (69). Así mismo, estos pueden ser sistémicos, es decir una vez pulverizados tienen efecto en las hojas, raíces y tallos de las plantas, siendo absorbidos y transportados dentro de los tejidos de las plantas a través del floema principalmente (70,71). También pueden ser trasladados desde la raíz a las hojas de algunas plantas, donde los insectos mueren por ingestión de la sustancia química (10,47). Respecto a los pesticidas no sistémicos, estos tienden a ser lipofílicos como el clorpirifos y debido a que poseen una alta partición octanol-agua, no pueden translocarse hacia arriba después de ser absorbidos quedándose en la superficie donde fue aplicado ya sea en las hojas, tallos o suelo (72,73). Los cultivos de frutas contienen ceras epicuticulares, cuya composición y cantidad varían según la especie vegetal. Cuando un pesticida llega al cultivo, ya sea por aplicación agrícola o contaminación atmosférica, puede interactuar con la cutícula y las ceras epicuticulares mediante retención o absorción. El clorpirifos al actuar por contacto e ingestión, presenta una baja capacidad de translocación en los tejidos vegetales (hojas, frutos o raíces) debido a la barrera formada por la cutícula y ceras epicuticulares (73). Sin embargo, debido a su naturaleza apolar y elevado coeficiente de partición, el clorpirifos presenta una fuerte afinidad por la cutícula foliar y la capa cerosa de las plantas.

Esta propiedad le permite adherirse firmemente a la superficie vegetal, resistiendo el lavado por lluvias y prolongando su permanencia en el cultivo. Por ende, se incrementa el riesgo potencial para el consumidor (73–76).

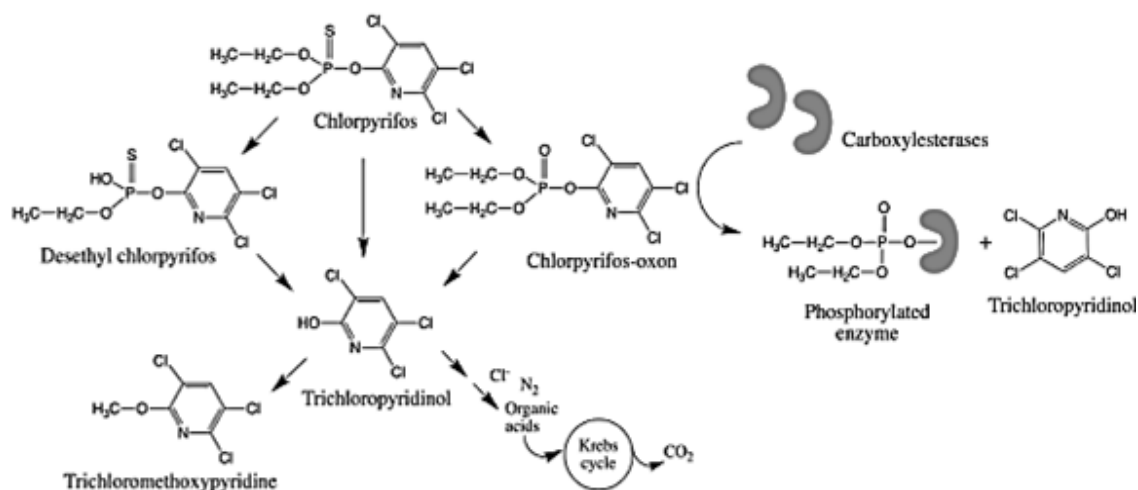


Figura 2. Degradación del pesticida clorpirifos en el medio ambiente.

* Sanchez (67).

En la Figura 2, se encuentran los compuestos en los que se degrada el clorpirifos en el medio ambiente a diferentes condiciones ambientales. Se observa una desetilación que da lugar a un nuevo compuesto llamado desetil clorpirifos. Así también, el clorpirifos se degrada por hidrólisis o actividad microbiana en clorpirifos-oxon y este por acción de carboxilesterasas se oxida a tricloropiridinol y este nuevo compuesto se desmetila a triclorometoxipiridina (67,77). Todos estos nuevos compuestos son producto de la degradación del clorpirifos bajo diferentes condiciones ambientales.

1.1.2.4. Marco legal del límite máximo de residuos de clorpirifos en Perú

En Perú de acuerdo con la Resolución Ministerial N° 1006-2016/MINSA y Decreto Legislativo N°1062, se estableció según la Ley de Inocuidad de los Alimentos, los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola permitidos en los alimentos destinados al consumo humano, para fines de vigilancia y control sanitario. En cultivos como ajo, zapallo, quinua, maíz, lechuga, frijol el LMR era de 0.05 mg/kg de clorpirifos y en otros cultivos como arroz, tomate y uva el LMR permitido era de 0.5 mg/kg (78,79). Sin embargo, en el año 2023, el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, a través de SENASA oficializó la Resolución Directoral N° 0032-2023-MIDAGRI-SENASA, en donde los Artículos N°1 y 4 contemplan la prohibición del empleo y comercialización de pesticidas que contengan clorpirifos como ingrediente activo en su formulación.

La disposición regulatoria se hizo efectiva a partir del 1 de agosto del año 2024 (80–82). No obstante, a pesar de su prohibición en el Perú, en septiembre del 2024 reportaron que 11 de un total de 60 muestras recolectadas de diversos mercados del país situados en Lima, Arequipa, Cusco, Huánuco y Ancash contenían clorpirifos en alimentos como apio, pimiento, cebolla china y tomate (83). Así mismo, en enero del año 2025, reportaron altos niveles de pesticidas en piñas en mercados concurrentes de la ciudad de Lima, entre los pesticidas detectados se encontraron clorpirifos, dimetoato y ometoato (84). Posteriormente en junio, a través de un plan de farmacovigilancia inspectores de SENASA recolectaron muestras en tres supermercados de Lima: Wong, Tottus y Plaza Vea. Los resultados del monitoreo revelaron que el 65 % de muestras analizadas superaron los niveles de contaminación permitidos por la normativa vigente. Además, en cinco de ellas se identificaron pesticidas prohibidos como el carbofurano, metamidofos y clorpirifos. Este último fue detectado en alimentos como pimiento, tomate y ají amarillo (85).

1.2. Metodologías para la cuantificación de clorpirifos

Se ha demostrado que varios métodos para la identificación de clorpirifos son factibles, incluida la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (86–88), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (89–91), así como cromatografía en capa fina (TLC) (92–94). Su detección directa en muestras reales suele representar un desafío debido a que suelen estar presentes en concentraciones bajas y su análisis se ve dificultado por la interferencia de matrices complejas (7,95).

1.2.1. Tipos de cromatografía

1.2.1.1. Cromatografía de fase normal

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es más polar (hidrófila) que la fase móvil haciendo que los disolventes orgánicos apolares (hexano, cloroformo o éter dietílico) viajen más rápido y se eluyan primero debido a la menor afinidad que tiene por la fase estacionaria. Cuanto más fuerte sea la interacción entre el analito y la fase estacionaria, más larga será la retención de los compuestos polares de las muestras (43,96,97).

1.2.1.2. Cromatografía de fase reversa

La cromatografía de fase reversa se basa principalmente en interacciones hidrofóbicas o de Van der Waals donde la superficie de la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y se encuentra compuesta de un grupo funcional octilo (C8) u octadecilo (C18) unido al gel de sílice.

La fase móvil suele estar compuesta por disolventes moderadamente polares como agua, acetonitrilo o metanol, siendo los componentes polares los primeros en ser eluidos mientras que los componentes apolares quedan retenidos durante más tiempo (43,96–98).

1.2.1.3. Cromatografía por iónico

La cromatografía de intercambio iónico permite la separación de moléculas como aniones y cationes inorgánicos debido a las distintas afinidades que presentan los iones del analito hacia los sitios cargados de la fase estacionaria (99).

1.2.2. Mecanismos de separación en cromatografía

Los mecanismos de separación en cromatografía se basan principalmente en fuerzas hidrofóbicas e hidrofílicas. Así también procesos fisicoquímicos como adsorción, partición e intercambio iónico fundamentan la capacidad de retención y selectividad por parte del analito hacia la fase móvil y estacionaria del tipo de cromatografía (100).

1.2.2.1. Adsorción

Emplea una fase estacionaria compuesta por materiales adsorbentes como la sílica o alúmina, donde el eluyente oleoso (hexano, octano, diclorometano) fluye sobre rellenos acuosos (96,101). En el mecanismo de separación por adsorción, los componentes apolares son los primeros en ser eluidos y los analitos polares son los que presentan un mayor tiempo de retención por su afinidad hacia la fase estacionaria polar (100).

1.2.2.2. Absorción o partición

El término “partición” hace referencia a métodos de separación de carácter hidrofóbico donde el eluyente oleoso (metanol, acetonitrilo, agua) fluye sobre rellenos oleosos. Este mecanismo de separación emplea como sorbente gel de sílice recubierto con una cadena de 18 carbonos y su separación se basa en la diferencia de solubilidad o afinidad que cada compuesto tiene por una u otra fase donde los componentes no deseados polares son los primeros en ser eluidos por la columna, mientras que el analito apolar con un alto poder de absorción se queda retenido durante mayor tiempo gracias a la afinidad que tiene por la fase estacionaria apolar (100,101).

1.2.2.3. Intercambio iónico

Hace referencia a las fuerzas hidrofílicas que ocurren entre la parte polar de la molécula del soluto y los centros iónicos de la superficie del sorbente (100).

Los sitios activos presentes en los intercambiadores iónicos pueden estar constituidos por grupos con carga positiva (retienen aniones) o grupos con carga negativa (retienen cationes) (96).

1.2.3. Adsorbentes empleados en cromatografía

1.2.3.1. Sílica

Es el soporte polar más común utilizado en cromatografía (102).

1.2.3.2. Florisil

Es un soporte polar selectivo compuesto de gel de sílice-magnesio útil para analizar residuos de pesticidas (103). Es un adsorbente poroso altamente polar y altamente activo que adsorbe compuestos objetivo de polaridad media y baja (104). Tales como pesticidas orgánicos que contienen cloro, nitrógeno y fósforo.

1.2.3.3. C18

Es el soporte no polar más utilizado, compuesto por gel de sílice modificado químicamente con grupos octadecilo (43,105). El sorbente C18 es empleado usualmente en cromatografía de fase inversa o reversa (106) y la elección de las condiciones más adecuadas para realizar una extracción está determinada por las características del analito, así como de la matriz en la que se encuentra.

1.3. Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica versátil empleada para la separación e identificación de analitos en una matriz de forma cuantitativa (107–110) y cualitativa (111) en ensayos de control de calidad (112). Es ampliamente utilizada debido a su simplicidad, rentabilidad, rapidez, bajo consumo de solvente y tiempo corto de análisis (113–115) en comparación con otras técnicas de separación. Posee la flexibilidad para trabajar con componentes tanto volátiles como no volátiles y permite la detección de pesticidas de diversas clases químicas. Además, puede aplicarse eficazmente en una amplia gama de matrices de muestra (30).

1.3.1. Cuantificación mediante densitometría con TLC

La densitometría es un método para medir la concentración de las zonas cromatográficas en la capa de TLC revelada sin alterar las sustancias separadas (116).

Su principio se basa en la medición de la densidad óptica dentro del espectro UV-Visible, lo que permite una cuantificación precisa de los compuestos estudiados. El escaneo se evalúa registrando la luz reflejada cuando un haz estrecho de luz se mueve a través de la placa a una determinada longitud de onda. Posteriormente, la luz es transformada en una señal eléctrica mediante un fotomultiplicador, la cual es enviada a un sistema de registro donde las bandas aparecen en forma de picos cuya área es proporcional a la concentración del compuesto analizado (117). Dando como resultado densitogramas muy similares a los obtenidos en HPLC (31,109,118).

1.3.2. Fundamento de la técnica cromatografía en capa fina

Utiliza un adsorbente sólido que puede ser gel de sílice o alúmina, el cual funciona como soporte estacionario con una amplia gama de propiedades de sorción para optimizar la selectividad del método (118), mientras que la fase móvil está compuesta por disolventes orgánicos. Su principio se basa en la diferencia entre la fuerza de adsorción y el coeficiente de distribución, lo cual permite la separación de las mezclas (30). En cuanto al rendimiento de la técnica de cromatografía en capa fina, este depende de la concentración del analito y el disolvente empleado en la fase móvil (119).

1.3.2.1. Factor de retención (R_f)

El factor de retención se calcula como la proporción entre la distancia recorrida por el analito y la distancia alcanzada por el frente del solvente sobre la placa cromatográfica (118). Para aumentar la repetibilidad en la medición del factor de retención del analito en la muestra, se establece una relación comparativa con el valor de R_f correspondiente a un estándar (100).

1.3.2.2. Aplicación de la muestra

La aplicación de la solución de muestra a la capa adsorbente suele realizarse manualmente mediante microjeringas o capilares de vidrio (117).

1.3.2.3. Cámaras de desarrollo y revelado

Las cámaras de vidrio rectangulares con tapa se emplean habitualmente para un revelado lineal ascendente en mezclas de disolventes. La fase móvil se añade a la cámara y el eluyente migra por capilaridad por la parte inferior de la placa (100,117).

1.3.2.4. Derivatización post cromatográfica

La derivatización consiste en la aplicación de reactivos químicos de detección a la placa ya sea por inmersión o pulverización para dar una coloración al analito en estudio y pueda ser visualizada químicamente por el espectro visible (100,117,120,121). Así mismo, si un componente de la muestra es indetectable, ayuda mejorar la selectividad o la sensibilidad de la detección. Sin embargo, si la sustancia analizada absorbe luz UV, blanca o puede excitarse para fluorescer, es posible realizar una evaluación densitométrica del cromatograma sin derivatización (100,117).

1.4. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento es una forma mejorada de cromatografía líquida que se ha desarrollado con éxito para monitorear, identificar y cuantificar pesticidas organofosforados en matrices (17,43).

El método de HPLC se fundamenta principalmente en la separación de los componentes de una mezcla según sus afinidades por la fase móvil y la fase estacionaria empleadas en el sistema de separación (43). Para garantizar una separación eficiente, es esencial que el pesticida de interés presenta una adecuada solubilidad en la fase móvil, ya que esta condición favorece su migración a través de la columna cromatográfica y su posterior detección (19).

1.4.1. Componentes básicos del HPLC

1.4.1.1. Bombas impulsadoras

El sistema de bombeo principal consta de una o más bombas capaces de suministrar fase móvil a través de una columna cromatográfica a presión constante (98).

1.4.1.2. Sistema de almacenamiento de fase móvil

En el sistema de HPLC, la fase móvil se almacena en envases de vidrio denominados reservorios. Esta fase, también denominada disolvente, suele estar compuesta por una mezcla de líquidos polares y no polares, cuyas proporciones se ajustan según las características de la muestra para lograr una adecuada separación y cuantificación de los analitos presentes (96).

1.4.1.3. Inyectores

La función del inyector en el HPLC es añadir un volumen pequeño de la solución que contiene a la muestra, en la fase móvil. Este proceso puede realizarse mediante un sistema de inyección manual o automatizado (98).

1.4.1.4. Detectores

El proceso de detección se fundamenta en registrar la absorbancia de los analitos a medida que atraviesan el detector, lo que permite su identificación y posterior cuantificación (96,98).

1.4.1.5. Columna

La columna cromatográfica constituye el componente principal del sistema HPLC, ya que está específicamente diseñada para llevar a cabo la separación de los componentes de una muestra (98).

1.4.1.6. Sistema de control y procesamiento de datos

El sistema de control y datos en HPLC es una computadora con capacidad de adquisición de datos que integra la respuesta del detector a cada componente y la coloca en un cromatógrafo que es fácil de leer e interpretar (96,98).

1.4.2. Métodos de elución en HPLC

La elución del soluto se lleva a cabo mediante dos métodos en HPLC como se indica a continuación.

1.4.2.1. Elución isocrática

El modo de elución isocrática emplea un solo disolvente o una combinación constante de disolventes a lo largo de toda la corrida cromatográfica, lo que permite la separación de compuestos con propiedades similares. Es especialmente popular en aplicaciones rutinarias debido a su facilidad de operación, ya que requiere una sola bomba para bombear los disolventes (43,96).

1.4.2.2. Elución en gradiente

Se emplean disolventes con una polaridad significativamente diferente. Una vez iniciada la elución, la composición del eluyente cambia continuamente con el tiempo, lo que conlleva un cambio constante en la interacción entre el eluyente y la fase estacionaria. La elución en gradiente mejora considerablemente la eficiencia de separación (43). En la literatura, se han adoptado métodos de elución isocrática y de gradiente de acuerdo a la composición de la muestra, es decir, si contiene diferentes clases de pesticidas o una mezcla de pesticidas organofosforados.

1.5. Método analítico

El método analítico se refiere a la forma de realizar el análisis que incluye preparación de estándares, muestras, así como la generación de una curva de calibración y un posterior tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Se pueden utilizar para diferentes propósitos, como control de procesos, desarrollo de productos, control de calidad e investigación.

1.5.1. Validación de un método analítico

La validación de un método analítico certifica que el método funcione conforme a los objetivos para los cuales fue desarrollado. Consiste en el ajuste de condiciones para que un método proporcione resultados confiables, precisos y exactos brindando valores cercanos al real para el contenido del analito en la muestra en cada futura medición (122,123).

1.5.2. Parámetros analíticos

1.5.2.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico indica la dependencia lineal entre la concentración de una sustancia y la respuesta del detector. Tanto para TLC como para HPLC se construyen curvas de calibración con estándares de referencia (98).

1.5.2.2. Precisión

La precisión se determina a través de la repetibilidad y la precisión intermedia, la repetibilidad se refiere a la precisión obtenida por un solo operador en un determinado laboratorio empleando el mismo equipo, reactivos e instrumentación (124). La precisión intermedia se estima de la misma manera que la repetibilidad. Sin embargo, las muestras pueden ser preparadas por otro analista y empleando diferentes equipos (98,124).

1.5.2.3. Límite de detección

La menor cantidad de un analito que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar en condiciones experimentales establecidas (111,119,123,125).

1.5.2.4. Límite de cuantificación

Concentración mínima de un analito que permite obtener resultados cuantitativos con precisión y exactitud bajo condiciones experimentales definidas (98,111,119).

1.5.2.5. Selectividad

La selectividad hace referencia a la capacidad de un método analítico para identificar y cuantificar con precisión el analito de interés, incluso cuando se encuentra acompañado de otras sustancias como productos de degradación o componentes propios de la matriz, sin que estas interfieran en el resultado (126).

1.5.2.6. Exactitud

La exactitud se define como la relación entre el valor promedio obtenido experimentalmente y el valor real. Se determina mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una concentración previamente conocida (126).

1.5.2.7. Reproducibilidad y robustez

La reproducibilidad se refiere al grado de concordancia entre los resultados obtenidos de manera independiente, es decir por diferentes analistas en distintos laboratorios y diferentes equipos. Mientras que la robustez confirma la capacidad del método analítico para mantener la consistencia de los resultados aun cuando se realizan cambios en las condiciones experimentales (126,127).

1.6. Cultivo de ajo en el Perú

El *Allium sativum*, conocido comúnmente como ajo, es una hortaliza de origen asiático (25,128–130) utilizado como sazónador en su forma fresca, molida o deshidratada y también se consume directamente de forma cruda con y sin cáscara ya sea en asado, infusiones, al horno, confitado, encurtido o hervido (131,132). El consumo de ajo está asociado con diversos efectos positivos para la salud, entre ellos la prevención de enfermedades cardiovasculares (21), el tratamiento de infecciones respiratorias (133) así como en la estimulación del sistema inmunológico (134). Estos efectos se atribuyen principalmente a los compuestos organosulfurados presentes en su composición (135) siendo Perú el principal productor y exportador de ajo dentro de la Comunidad Andina (129). En diciembre del 2024, se exportó 2614 toneladas de ajo por \$7.5 millones (136), siendo México el país donde se destinó la mayor parte de ajo cosechado (137).

1.6.2. Cultivo de ajo en Arequipa y su exportación

El ajo se cultiva a lo largo de todo el año, siendo Arequipa la principal región productora a nivel nacional. En el año 2024 presentó más del 72% de área sembrada por la calidad de su producto y el alto rendimiento, según reportes de MIDAGRI (139).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Campo de verificación

2.1.1. Ubicación espacial

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de investigación “Proyecto Mercurio”, Campus Central Universidad Católica de Santa María, ubicado en el Pabellón H, Aula 202.

2.1.2. Ubicación temporal

El trabajo experimental se realizó entre los meses de noviembre del 2024 y junio del 2025 conforme a la disponibilidad de los equipos analíticos.

2.1.3. Unidades de estudio

Se realizó la comparación de los parámetros de ambas metodologías de HPLC y densitometría con TLC para la cuantificación de clorpirifos empleando como matriz bulbos de ajo en estado comercial.

2.2. Técnicas, instrumentos y materiales de verificación

2.2.1. Materiales y reactivos

Equipos:

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución Hitachi®
- Densitómetro TLC Explorer Documentation System Merck® SN 24050083
- Baño de ultrasonido BRANSONIC® 2510E – DTH
- Centrífuga de laboratorio Dr.N.GERBER®
- Unidad de purificación de agua ultra-pura Simplicity UV®
- Balanza digital Sartorius®
- Campana extractora de gases BIOBASE FH1000

Materiales:

- Viales de 2 mL para HPLC
- TLC Silicagel 60 F_{254} Supelco
- Columna SUPELCOSIL™ LC-PAH RP18, tamaño de partícula de 5 μm y dimensiones de 250 cm \times 4.6 mm
- Anotop Millex LCR C/Membrana PTFE modificada para filtración de solventes orgánicos 0,45 μm 13 mM

- Tubos Falcon de 15 mL CytoOne
- Micropipetas de 5-50 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L
- Tips para micropipetas
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL
- Pipetas volumétricas de 2 mL
- Pipeta pasteur
- Capilares Laboratory glass, 75 mm
- Matraz aforado de 2 mL
- Nescofilm
- Papel aluminio
- Lápiz mecánico con mina
- Jeringa 1 mL
- Beakers de 50 mL, 100 mL
- Regla
- Fiolas
- Tubos de ensayo
- Soporte universal
- Pinza doble nuez
- Erlenmeyer de 250 mL
- Pinzas universales de laboratorio
- Cámara cromatográfica con tapa para TLC
- Pinza disección
- Espátula
- Placa petri de vidrio
- Agua destilada

Reactivos:

- Estándar de clorpirifos Sigma Aldrich 94114
- Estándar de 2,3,5-tricloropiridina Sigma Aldrich 102443176
- Sulfato de sodio (grado QP) Merck
- Florisil® (grado PA) Merck
- Éter dietílico (grado QP) Merck
- Cloroformo (grado QP) CDH
- Ciclohexano (grado QP) Merck

- Acetonitrilo (grado HPLC) LiChrosolv® Merck
- *n*-hexano (grado HPLC) LiChrosolv® Merck
- Nitrato de plata (grado QP) Merck
- Etanol 96%

2.2.2. Proceso de extracción de clorpirifos y posterior purificación empleando como matriz bulbos de ajo

La técnica de extracción se fundamenta en un método estándar donde el analito deseado se libera de la matriz de la muestra con la consecuente limpieza de interferentes propios de la matriz que ayuda a mejorar la detección y cuantificación del analito (140).

2.2.2.1. Extracción de clorpirifos en los bulbos de ajo

El desempeño de la técnica de extracción va a depender de las propiedades específicas del pesticida como la volatilidad, polaridad, solubilidad en agua y densidad (43,54,140). Adicionalmente, como parte del método de extracción, la agitación manual (141), mecánica y ultrasónica es necesaria (47,142). La extracción asistida por ultrasonido ayuda a mejorar la eficiencia de la extracción mediante el uso de ondas ultrasónicas que generan microburbujas que provocan ruptura en las paredes celulares del ajo, lo que hace eficaz la extracción del pesticida de la matriz de la muestra (140). Durante el proceso de extracción, los residuos de pesticidas se concentran y se separan del resto de la muestra utilizando un disolvente orgánico adecuado, la elección del disolvente para la extracción varía según la naturaleza del sustrato y el tipo de pesticida a analizar, siendo de vital importancia que posea una buena solubilidad en el pesticida y no modifique ni reaccione químicamente con el pesticida (140). Investigaciones previas reportaron que los disolventes frecuentemente empleados para evaluar pesticidas organofosforados en frutas y verduras son hexano, acetonitrilo (18,86,143), acetato de etilo (6,18,143), diclorometano (6,43,144), metanol (43) y tolueno (47), los cuales mejoran la recuperación de los métodos (6). Por otra parte, el clorpirifos al ser un compuesto insoluble en agua (1.66 mg/L a 25 °C) (54,145), los solventes apolares son ideales para su extracción. Es por ello, que para la extracción del pesticida en bulbos de ajo se empleó hexano ya que posee una solubilidad de 0.0095 mg/mL a 25°C (146), lo cual lo hace ideal para su adecuada extracción (18,47,147,148). Para todos los tratamientos de extracción en ajo se pesó 1 gr de muestra en tubos Falcon debidamente rotulados, luego a cada tubo se le agregó 1 mL de hexano y se agitaron en vortex durante 8 minutos.

Seguidamente se realizó una sonicación durante 8 minutos a una temperatura menor 15°C y finalmente un paso de centrifugación de 10 minutos a 6000 rpm.

Este procedimiento se realizó tres veces consecutivas y se recolectó cada sobrenadante hasta obtener el volumen de 2 mL en un matraz aforado el cual también se sumergió en un baño de hielo a 10°C hasta realizar el procedimiento de *clean up* para evitar su degradación.

2.2.2.2. Procedimiento de *clean up* de los extractos

La etapa de preparación de la muestra constituye el paso más determinante del procedimiento analítico, ya que de ella depende en gran medida la eficiencia de la recuperación del analito. Los nuevos requisitos legislativos exigen extraer los residuos de plaguicidas con alta selectividad, eliminando las interferencias de la matriz mediante una limpieza adecuada y así obtener una excelente resolución cromatográfica (18). Para cumplir con estos requisitos, se realizó una metodología modificada en base a los lineamientos propuestos por el método “U.S. EPA 3620C, el cual sugiere el empleo de florisil como fase sólida y como fase extractante al hexano ya que poseen una excelente capacidad de extracción de clorpirifos (149) mostrando un porcentaje de recuperación mayor al 80% (150). El Florisil® es un adsorbente poroso altamente polar compuesto de gel de sílice adherido a óxido de magnesio, su principio se basa en la adsorción de compuestos objetivo de polaridad media o baja, es decir pesticidas que presentan moléculas de cloro, nitrógeno o fósforo en su estructura (103,151). La limpieza con Florisil® se puede lograr empleando cartuchos de extracción en fase sólida que contengan dicho adsorbente (148). El disolvente propuesto en el método “U.S. EPA 3620C” es el hexano para la extracción de pesticidas organofosforados en alimentos. Por ello, para el procedimiento de limpieza de los extractos obtenidos, primero se pesó 300 mg de sulfato de sodio anhidro (2 horas, 120°C) y 600 mg de florisil. Luego se procedió a implementar el contenido del cartucho añadiendo primero florisil en la parte inferior y en la parte superior una capa de sulfato de sodio anhidro. Después se realizó un acondicionamiento con 3 mL de hexano y antes de exponer la capa de sulfato de sodio al aire, se cargó 2 mL de cada extracto que se obtuvo en diferentes cartuchos, se añadió 2 mL de hexano para realizar el lavado de excipientes y se dejó secar el cartucho al vacío por un tiempo de 20 minutos con el fin de eliminar el agua retenida en el adsorbente y evitar la pérdida del pesticida organofosforado (105). Transcurrido el tiempo, se agregó una fase eluyente compuesta por hexano y éter dietílico (15:85) para un volumen de 10 mL, los cuales fueron recolectados en diferentes tubos de ensayo ya que es la fracción que contiene al clorpirifos.

Posteriormente se evaporó al medio ambiente en beakers para su concentración y finalmente se reconstituyó en un volumen de 2 mL de acetonitrilo para su análisis correspondiente por HPLC y densitometría con TLC.

Este procedimiento se realizó para la validación del parámetro de exactitud y para el tratamiento de las muestras de bulbos de ajo.

2.2.3. Validación de la técnica de densitometría con TLC para la determinación de clorpirifos

La validación de un método analítico según la AOAC requiere una evaluación rigurosa de diversos parámetros que garanticen su fiabilidad. Por consiguiente, la técnica de densitometría con TLC fue validada mediante la verificación de criterios como la linealidad, precisión, selectividad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, considerando la naturaleza de la técnica y su aplicación para la determinación de clorpirifos empleando como matriz bulbos de ajo. Para la estandarización de la fase móvil, se probó de forma independiente el disolvente orgánico cloroformo y ciclohexano, cada uno en un volumen de 5 mL. Sin embargo, el clorpirifos en la fase móvil de ciclohexano no eluyó debido a que presentó una mayor afinidad por el solvente que por la sílica a diferencia de la fase móvil de cloroformo que si logró eluirse. Por consiguiente, se empleó una mezcla de ambos disolventes en una proporción de 40:60 (v/v) de ciclohexano:cloroformo respectivamente. Así también, se estandarizó el tiempo de saturación de la fase móvil dentro de la cámara cromatográfica a 30 minutos. A continuación, se mencionan las condiciones ejecutadas en todos los procedimientos realizados empleando este método:

- Placa cromatográfica: TLC Silica gel 60 F₂₅₄ Sigma Aldrich
- Tamaño de placa: 6 cm largo x 5 cm ancho
- Cámara cromatográfica de doble canal
- Fase móvil: ciclohexano:cloroformo (40:60)
- Volumen de fase móvil: 5 mL
- Tiempo de saturación de fase móvil en la cámara cromatográfica: 30 minutos
- Volumen de siembra: 40 µL

2.2.3.1. Linealidad

El primer parámetro validado fue la linealidad y se evaluó preparando una curva de calibración de al menos cinco concentraciones calculando el coeficiente de correlación (R) que relaciona el área del pico del compuesto con la concentración evaluada.

Para ello, a partir de una solución estándar de 2554 mg L^{-1} de clorpirifos disuelto en acetonitrilo se prepararon estándares a concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 mg L^{-1} , estas soluciones se sembraron en la placa con capilares en un volumen de $40 \mu\text{L}$ por siembra y se corrieron bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente, se capturaron las bandas en el equipo mediante exposición a radiación UV a una longitud de onda de 254 nm en el equipo densitométrico TLC Explorer, el cual registra y cuantifica de acuerdo con la intensidad de las áreas en función de la absorbancia. Finalmente, la placa fue teñida con nitrato de plata 0.12 M , se secó a temperatura ambiente y posteriormente se llevó a una temperatura de $140 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre una hornilla eléctrica hasta el desarrollo de color. Esta evaluación fue realizada por triplicado.

2.2.3.2. Precisión de repetibilidad

La repetibilidad hace referencia al grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un mismo procedimiento analítico, es decir el mismo analista, utilizando el mismo equipo y en un intervalo de tiempo reducido. Para ello, se emplearon los mismos estándares usados en la evaluación del parámetro de linealidad. Se capturaron las bandas en el equipo después de la visualización, se detectaron y se integraron en un densitómetro para el análisis de sus áreas. Esta evaluación fue realizada por triplicado y los resultados se expresaron como CV (coeficiente de variación)

2.2.3.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia se estima de la misma manera que la repetibilidad. Sin embargo, las muestras pueden ser preparadas y sembradas por otro analista en días diferentes, con distintos instrumentos y en un mismo laboratorio. Para ello, se prepararon nuevos estándares de 30, 35, 40, 45 y 50 mg L^{-1} , se construyó un nuevo capilar, se sembró cada placa en tres días consecutivos y se corrieron bajo las condiciones mencionadas en el punto 2.2.3. Posteriormente, se capturaron las bandas en el equipo y se integraron para el análisis de sus áreas. Esta evaluación fue realizada por triplicado y los resultados se expresan como CV (coeficiente de variación).

2.2.3.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad o concentración de un analito que puede ser identificado por un método analítico, pero no necesariamente cuantificado. Su valor se calcula empleando la Ecuación 1 y 2:

$$LOD = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la menor concentración de un analito que puede ser cuantificado con un grado aceptable de precisión, se emplea la siguiente ecuación:

$$LOQ = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde, “ Y_{bl} ” corresponde al intercepto de la ecuación, mientras que “ S_{bl} ” corresponde al intercepto de la ecuación de la recta que relaciona las distintas concentraciones de clorpirifos con la desviación estándar de las áreas obtenidas por triplicado en el ensayo de linealidad, “ b ” denota la pendiente de la curva de calibración evaluada en dicho ensayo y “ n ” indica el número de estándares empleados. A partir de esta curva de calibración, se determinaron los valores LOD y LOQ mediante la Ecuación 1 y 2 las cuales se fundamentan en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración.

2.2.3.5. Selectividad

La selectividad de este método fue evaluada mediante la comparación de los R_f del clorpirifos y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina. Para ello, se empleó la misma fase móvil de ciclohexano:cloroformo (40:60).

2.2.3.6. Exactitud

La exactitud evalúa qué tan cerca está el valor medido del valor real y se determina mediante el porcentaje de recuperación. Según los lineamientos de la AOAC, la recuperación aceptable se da entre 70 y 125% dependiendo el nivel de concentración que se está evaluando. Este parámetro se evaluó mediante la técnica de adición estándar y para ello, se trabajó con tres tipos de muestra:

2.2.3.6.1. Estándar de clorpirifos

Para evaluar el porcentaje de recuperación de solo el estándar de clorpirifos a través del procedimiento de extracción y *clean up* se añadió 40 mg L⁻¹ de clorpirifos a un volumen de 2 mL de hexano en un tubo Falcon y se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 2.2.2.1. para la extracción y en el punto 2.2.2.2. para el procedimiento de *clean up*.

2.2.3.6.2. Muestra de ajo fortificado con clorpirifos

En cuanto al porcentaje de recuperación del estándar de clorpirifos en la muestra de ajo fortificada primero se trituró el bulbo de ajo en estado fresco y se añadió 40 mg L⁻¹ de clorpirifos, luego en un tubo Falcon se pesó 1 gramo de la muestra triturada previamente, se adicionó el volumen de 2 mL de hexano y se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 2.2.2.1. para la extracción y en el punto 2.2.2.2. para el procedimiento de *clean up*.

2.2.3.6.3. Matriz de ajo no fortificada (blanco)

Finalmente, para evaluar si en la muestra de ajo no fortificada hay trazas del pesticida primero se trituró el bulbo de ajo en estado fresco, luego en un tubo Falcon se pesó 1 gramo de la muestra triturada y se adicionó el volumen de 2 mL de hexano. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 2.2.2.1. para la extracción y en el punto 2.2.2.2. para el procedimiento de *clean up*.

2.2.3.7. Reproducibilidad y robustez

Los parámetros de reproducibilidad y robustez no fueron evaluados en el presente estudio, dado que la Universidad dispone únicamente de un equipo densitométrico TLC Explorer, lo que impidió realizar una comparación entre laboratorios requerido para validar la reproducibilidad del método. En cuanto a la robustez, la exclusión de este parámetro se fundamenta en la naturaleza químicamente inestable del clorpirifos, cuya estructura puede verse comprometida ante cualquier variación en las condiciones de analíticas (152,153), originando productos de degradación no deseados y por ende afectar la interpretación de los resultados.

2.2.4. Validación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de clorpirifos en ajo

Luego de realizar la validación de la técnica de densitometría con TLC, se procedió a validar el método de HPLC. Por consiguiente, también se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión de repetibilidad, precisión intermedia, LOD, LOQ, selectividad y exactitud con el fin de comparar ambas metodologías. Las condiciones empleadas en todas las corridas cromatográficas son las siguientes:

- Columna: SUPELCOSIL™ LC-PAH, 5 µm con dimensiones de 250 cm x 4.6 mm
- Longitud de onda: 210 nm

- Temperatura: 25°C
- Flujo: 2 mL/min
- Fase móvil: acetonitrilo: agua ultra-pura (60:40)
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Lámpara: DAD
- Elución isocrática

2.2.4.1. Linealidad

La linealidad como se ha mencionado anteriormente es uno de los parámetros esenciales en la validación de métodos analíticos dado que relaciona la respuesta instrumental con la concentración del analito dentro de un rango definido. Para su evaluación se preparó una curva de calibración a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ de clorpirifos enraizados con acetonitrilo en fiolas de 2 mL.

Luego los estándares de clorpirifos preparados fueron filtrados con anotop para su posterior lectura en viales de HPLC y se procedió a la construir curvas de calibración, las cuales se realizaron por triplicado en un mismo día.

2.2.4.2. Precisión de repetibilidad

Verificada la linealidad del método en los seis niveles de concentración, se continuó con la evaluación de la precisión de repetibilidad del método, Para ello, se tomaron los datos de la curva linealidad, la cual fue elaborada por triplicado en un mismo día manteniendo constante las condiciones experimentales.

2.2.4.3. Precisión intermedia

La precisión intermedia fue realizada en diferentes días, se prepararon nuevos estándares bajo las mismas concentraciones de la curva de linealidad, así como una nueva preparación de fase móvil de acetonitrilo:agua (60:40).

2.2.4.4. Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

Para estimar los valores de LOD Y LOQ se utilizaron las áreas reportadas en la evaluación de la linealidad y se construyó una gráfica que relaciona las concentraciones estudiadas con sus respectivas desviaciones estándar, obteniéndose Y_{bl} y S_{bl} .

2.2.4.5. Selectividad

En cuanto a la selectividad del método de HPLC, se corrió la muestra de clorpirifos y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina. Esto con el fin de distinguir el analito de otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz (126). De esta forma se logró garantizar su selectividad bajo las condiciones establecidas en cada corrida cromatográfica.

2.2.4.6. Exactitud

La exactitud del método de HPLC fue evaluada mediante ensayos de recuperación a un nivel de concentración de 4 mg L^{-1} realizado por triplicado, este paso se realizó en simultáneo con el método de densitometría con TLC. Es decir, se trabajó también con tres tipos de muestra como el estándar clorpirifos puro, muestra de ajo fortificada con 4 mg L^{-1} del estándar clorpirifos y muestra de ajo no fortificada.

2.2.4.6.1. Estándar de clorpirifos

Para evaluar el porcentaje de recuperación correspondiente únicamente al estándar de clorpirifos, se adicionó 4 mg L^{-1} de clorpirifos a un volumen de 2 mL de hexano contenido en un tubo Falcon. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 2.2.2.1. para la extracción y en el punto 2.2.2.2. para el procedimiento de *clean up*.

2.2.4.6.2. Muestra de ajo fortificada con clorpirifos

En cuanto a la evaluación del porcentaje de recuperación del estándar de clorpirifos en la muestra de ajo, primero se trituró el bulbo de ajo en estado fresco y se añadió 4 mg L^{-1} de clorpirifos. Luego en un tubo Falcon se pesó 1 gramo de la muestra triturada y se adicionó el volumen de 2 mL de hexano. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento detallado en el punto 2.2.2.1. para la extracción y en el punto 2.2.2.2. para el procedimiento de *clean up*.

2.2.4.6.3. Matriz de ajo no fortificada (blanco)

Finalmente, para evaluar si en la matriz no fortificada había trazas de clorpirifos, se trituró el bulbo de ajo, luego en un tubo Falcon se pesó 1 gramo de la muestra triturada y se adicionó el volumen de 2 mL de hexano. Seguidamente, se aplicaron los procedimientos descritos en los apartados 2.2.2.1 y 2.2.2.2 para la extracción del pesticida y el procedimiento de *clean up* respectivamente. Cada eluato fue recolectado en diferentes beakers, se concentraron, se reconstituyeron en 2 mL con acetonitrilo y finalmente fueron analizados por el equipo de HPLC. Este procedimiento se realizó por triplicado a un nivel concentración de 4 mg L^{-1} .

2.2.5. Recolección de muestras

Para realizar la cuantificación de clorpirifos en los bulbos de ajo, se realizó un muestreo aleatorio simple en mercados mayoristas y minoristas de la zona Norte, Sur y Este de la ciudad de Arequipa y se escogieron los mercados más representativos por cada zona (Tabla 1). Las muestras fueron registradas con criterio de trazabilidad considerando la procedencia geográfica del cultivo, así como la variedad del ajo las cuales fueron Napurí, Chino, Arequipeño y el recientemente lanzado en el mercado INIA 105 DONAJUS, el cual presenta la peculiar característica de tener un ciclo vegetativo de 5 meses con el fin de obtener un mejor rendimiento y calidad del cultivo de ajo (139).

Tabla 1. Lista de mercados muestreados en la ciudad de Arequipa.

Mercado	Zona	Tipo de mercado	Variedad	Origen del cultivo
Mercado Señor de Huanca	Zona Norte	Mayorista	INIA 105 DONAJUS	Chivay
Mercado Señor de Huanca	Zona Norte	Mayorista	Ajo Chino	Tiabaya
Mercado Acomare	Zona Norte	Mayorista	Ajo Arequipeño	Polobaya
Mercado Acomare	Zona Norte	Mayorista	INIA 105 DONAJUS	Tambo
Mercado Río Seco	Zona Norte	Mayorista	Ajo Arequipeño	Río Seco
Mercado Río Seco	Zona Norte	Mayorista	Ajo Napuri	La Joya
Mercado Altiplano	Zona Este	Minorista	INIA 105 DONAJUS	Tambo
Mercado Altiplano	Zona Este	Minorista	Ajo Chino	Tambo
Mercado 4 de agosto	Zona Sur	Minorista	Ajo Napuri	Arequipa
Mercado 4 de agosto	Zona Sur	Minorista	Ajo Chino	Tambo

2.2.6. Determinación de clorpirifos en las muestras de ajo recolectadas y su análisis por el método de HPLC y la técnica de densitometría con TLC

Para determinar clorpirifos en las muestras de ajo por el método de densitometría con TLC y HPLC previamente validados, cada muestra se procesó primero por extracción y luego por *clean up* descritos en el punto 2.2.2.1. y 2.2.2.2 respectivamente. Las condiciones para cada análisis son las mismas tanto para el método de extracción y *clean up* como para su lectura para cada método.

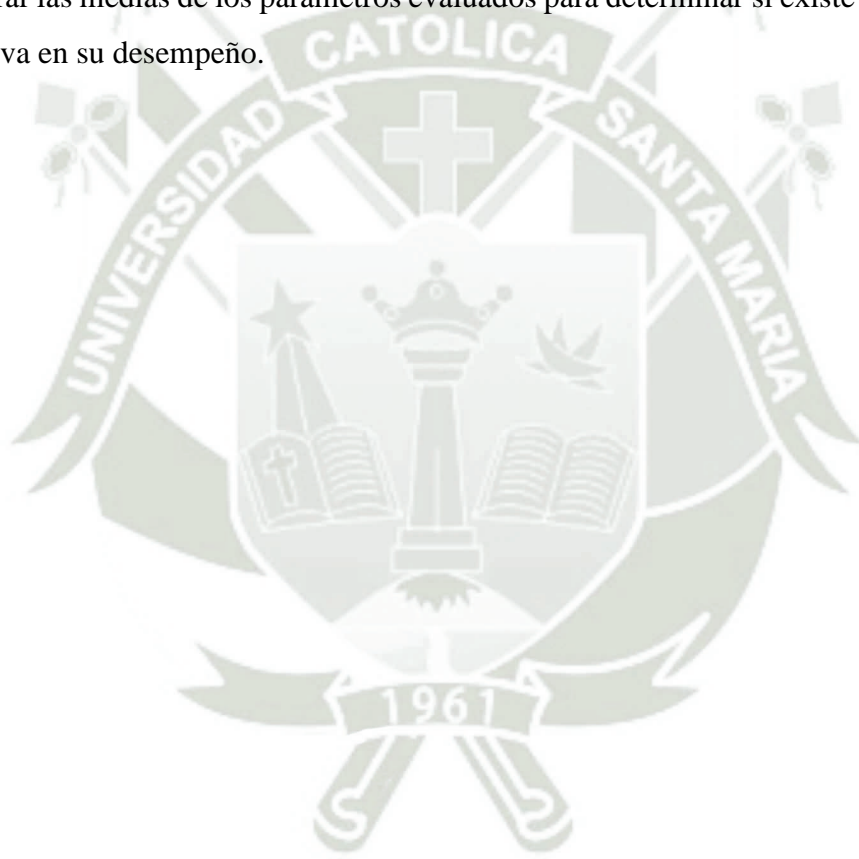
2.3. Estrategia y recolección de datos

El objetivo de la metodología empleada en esta investigación fue comparar el método de densitometría con TLC y HPLC.

Para realizar esta comparación, se emplearon estadísticos que ayudaron a evaluar si existen diferencias significativas en cuanto a los parámetros de validación y así realizar su posterior aplicación para la determinación de clorpirifos en bulbos de ajo como matriz.

2.3.1. Análisis estadístico

Para el correcto procesamiento de los datos obtenidos en ambos métodos, los parámetros de linealidad, exactitud, precisión intermedia y de repetibilidad se compararon a través del estadístico F para comparar las varianzas de los resultados obtenidos a través la técnica de densitometría con TLC y el método de HPLC. Luego se empleó el estadístico t con el propósito de comparar las medias de los parámetros evaluados para determinar si existe alguna diferencia significativa en su desempeño.





CAPÍTULO III

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Procedimiento de extracción y *clean up*

Respecto a la metodología empleada para la extracción de clorpirifos en bulbos de ajo, se inició con la preparación de las muestras, las cuales fueron previamente trituradas para facilitar la liberación del analito. Posteriormente se llevó a cabo la extracción en tubos Falcon utilizando hexano como disolvente, el cual fue añadido a las muestras de ajo seguido de un proceso secuencial que incluyó agitación vorticial, sonicación y centrifugación. Este protocolo fue repetido por triplicado con el fin de maximizar la eficiencia de recuperación del compuesto. Luego se realizó una metodología de *clean up* modificada en base al método “U.S. EPA 3620C” propuesto por la EPA, el cual sugiere el empleo de florisil como fase sólida y como fase eluyente una mezcla de hexano y éter dietílico (85:15). Al ejecutar la misma proporción, el porcentaje de recuperación de clorpirifos fue del 26.70 % para la matriz de ajo. Sin embargo, invirtiendo la proporción de hexano y éter dietílico a 15:85 respectivamente la recuperación aumentó a 65.70 %. Luego se ajustaron los volúmenes agregados en cada etapa de la extracción, 3 mL para el acondicionamiento, 2 mL de lavado y una fase de elución de 10 mL (1.5 mL hexano y 8.5 mL éter dietílico) resultando un porcentaje de recuperación por encima de 90 % corroborado por ambas metodologías. Estos hallazgos evidencian que factores como el volumen de acondicionamiento y lavado con hexano, la proporción y volumen de la fase eluyente, así como la cantidad en gramos de florisil dentro del cartucho juegan un papel crucial para obtener una adecuada recuperación del pesticida clorpirifos a través del proceso de extracción y *clean up* empleando como matriz bulbos de ajo.

3.2. Validación del método de densitometría con TLC

Una vez establecido el procedimiento para la extracción de clorpirifos en bulbos de ajo, se procedió a validar el método de densitometría con TLC donde las condiciones realizadas resultaron ser las adecuadas para la cuantificación del pesticida. Cada siembra se realizó en un volumen de 40 μ L en placas de TLC para luego ser eluidas con 5 mL de fase móvil ciclohexano y cloroformo (40:60) saturada previamente dentro una cubeta cromatográfica durante 30 minutos, lo cual favoreció la migración del pesticida clorpirifos obteniéndose un valor R_f de 0.5. En cada corrida, las lecturas fueron analizadas bajo la luz UV a una longitud de onda de 254 nm por el equipo densitométrico TLC Explorer.

3.2.1. Linealidad

Como parte del proceso de validación del método de densitometría con TLC, se evaluó el parámetro de linealidad con el objetivo de verificar la capacidad del sistema para generar una respuesta proporcional a distintas concentraciones del analito. Esta evaluación resultó fundamental para confirmar que el método permite una cuantificación confiable dentro del rango estudiado. Para ello, se prepararon soluciones estándar de clorpirifos en concentraciones de 30, 35, 40, 45 y 50 mg L⁻¹, las cuales fueron sembradas por triplicado en un volumen de 40 uL sobre placas cromatográficas de TLC en una fase móvil de ciclohexano y cloroformo (40:60). Luego del desarrollo y revelado con la fase móvil, se midió la intensidad de las bandas mediante el sistema densitométrico, registrando así el área correspondiente a cada señal. Adicionalmente, se realizó una derivatización post cromatográfica a cada placa con nitrato de plata 0.12 M (disuelto en etanol 96 %) por el método de inmersión, después se secó al medio ambiente para luego ser colocada sobre una hornilla eléctrica durante 3 minutos a 140 °C, transcurrido el tiempo las bandas propias del pesticida desarrollaron un color amarillo.

Finalmente, para la construcción de la curva de calibración, se relacionaron los valores de las áreas con las concentraciones evaluadas (Figura 3) y de esta forma se evaluó el ajuste lineal del método. En la Tabla 2, se muestran estos valores obtenidos mediante el método de densitometría con TLC para las diferentes concentraciones del estándar de clorpirifos: 30, 35, 40, 45 y 50 mg L⁻¹. Cada nivel de concentración fue evaluado por triplicado, como parte del proceso de validación de la linealidad del método en donde se observó un incremento progresivo en el área de los picos cromatográficos conforme aumentaba la concentración del analito, lo cual evidencia que la curva de calibración se ajusta a los datos experimentales.

Tabla 2. Áreas correspondientes al parámetro de linealidad del método densitometría con TLC.

Concentración (mg L ⁻¹)	N° réplica (Área)			Promedio	Desviación estándar	CV
	1°	2°	3°			
30	53.1	51.7	52.6	52.47	0.71	1.35
35	62.1	62.9	63.8	62.93	0.85	1.35
40	71.1	74.5	72.7	72.77	1.70	2.34
45	82.6	83.6	84.5	83.57	0.95	1.14
50	94.2	94.1	93.5	93.93	0.38	0.40

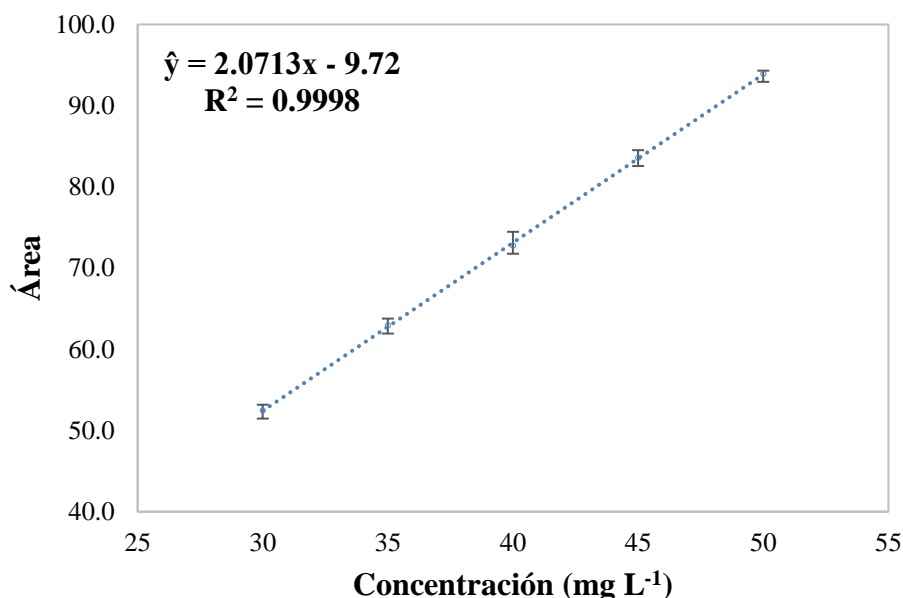


Figura 3. Curva de calibración para la evaluación de linealidad y repetibilidad de la técnica de densitometría con TLC.

La Figura 3 relaciona la concentración del analito (mg L^{-1}) en el eje X con el área de los picos obtenidos por el equipo densitométrico TLC Explorer en el eje Y donde el valor del coeficiente de correlación (R) para la curva de calibración de clorpirifos fue de 0.9999 lo cual demuestra que hubo un buen ajuste lineal. Adicionalmente se acopló los errores estándar representados por barras verticales para cada nivel de concentración, donde a un nivel de 40 mg L^{-1} la variabilidad es mayor respecto a los otros puntos lo cual sugiere una ligera disminución de la repetibilidad del método a esta concentración.

3.2.2. Precisión de repetibilidad

La precisión de repetibilidad se expresó como el coeficiente de variación (CV) entre réplicas, el cual fue evaluado con los datos generados en linealidad, considerando que se obtuvieron bajo las mismas condiciones en un mismo día por un único analista, empleando los mismos estándares e instrumentos. Este parámetro refleja el grado de dispersión de los datos respecto a su media y constituye un indicador clave para determinar la repetibilidad del método. En la Tabla 2 se detallan los valores del coeficiente de variación (CV) obtenidos para cada una de las concentraciones evaluadas. Los resultados mostraron que todos los valores se encontraron por debajo del 7.3 %, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la AOAC para métodos cuantitativos (Tabla 3) demostrando así ser un método preciso bajo las concentraciones estudiadas.

En la Tabla 3, se detallan los valores de CV aceptados por la AOAC:

Tabla 3. Valores aceptables de CV para el parámetro de precisión de repetibilidad según la AOAC.

Concentración	CV
100 %	1.3
10 %	1.9
1 %	2.7
0.1 %	3.7
100 mg/kg	5.3
10 mg/kg	7.3
1 mg/kg	11
100 ug/kg	15
10 ug/kg	21

* AOAC International (126)

3.2.3. Precisión intermedia

Luego de haber evaluado la precisión de repetibilidad con un rango aceptable de valores de CV según las directrices de la AOAC, se procedió a realizar la evaluación de precisión intermedia el cual consistió en mediciones realizadas por diferentes analistas, preparación de nuevos estándares para cada día, así como el empleo de nuevos capilares. En cuanto a los valores de CV aceptados para este parámetro, los porcentajes vienen a ser el doble a lo estipulado en la Tabla 3, es decir para una concentración 10 ppm el valor aceptable será hasta 14.6 %. Los valores de CV se observan en la Tabla 4, así como el promedio y desviación estándar de las áreas obtenidas para cada nivel de concentración.

Tabla 4. Áreas correspondientes al parámetro de precisión intermedia del método de densitometría con TLC.

Concentración (mg L ⁻¹)	N° réplica (Área)				Promedio	Desviación estándar	CV
	1°	2°	3°	4°			
30	52.6	50.6	53.1	51.7	52.00	1.10	2.11
35	63.8	63.3	62.1	62.9	63.03	0.72	1.14
40	72.7	72.6	71.1	74.5	72.73	1.39	1.91
45	84.5	82.7	82.6	83.6	83.35	0.89	1.07
50	93.5	95.7	94.2	94.1	94.38	0.94	0.99

Para cada nivel de concentración estudiado se calculó el CV con el propósito de determinar la precisión intermedia del método, estos fueron inferiores al 14.6 % cumpliendo con los criterios de aceptación estipulado por la AOAC dentro del rango evaluado.

3.2.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Luego de corroborar la linealidad, precisión intermedia y repetibilidad del método propuesto, se procedió al cálculo de los parámetros de límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Dichos valores fueron determinados a partir de la pendiente y desviación estándar de la curva de calibración, donde las ecuaciones de la recta de ambas gráficas (Figura 4 y 5) ayudaron a determinar los valores de límite de detección y cuantificación.

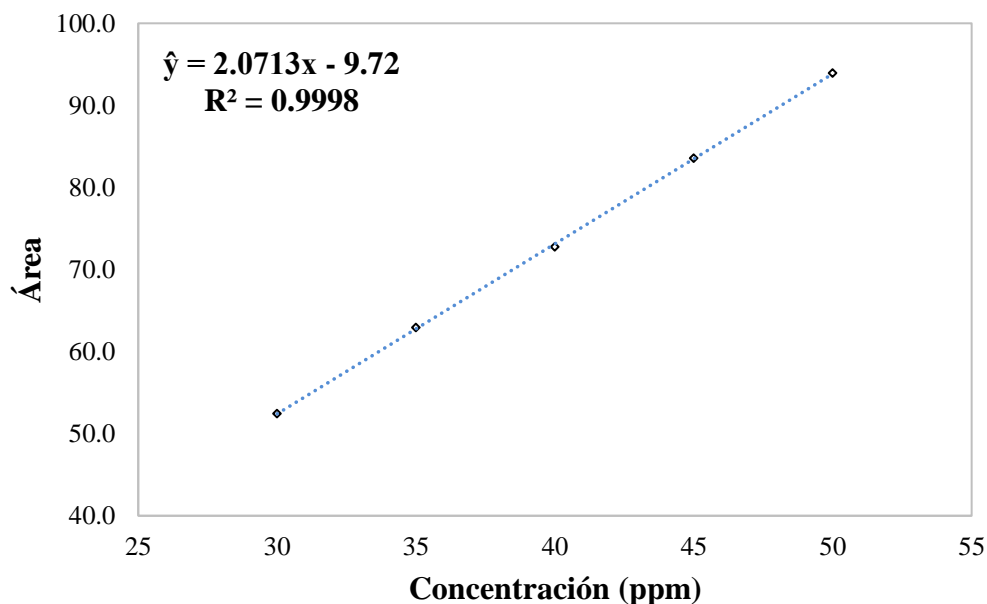


Figura 4. Gráfica empleada para la evaluación de LOD y LOQ del método de densitometría con TLC.

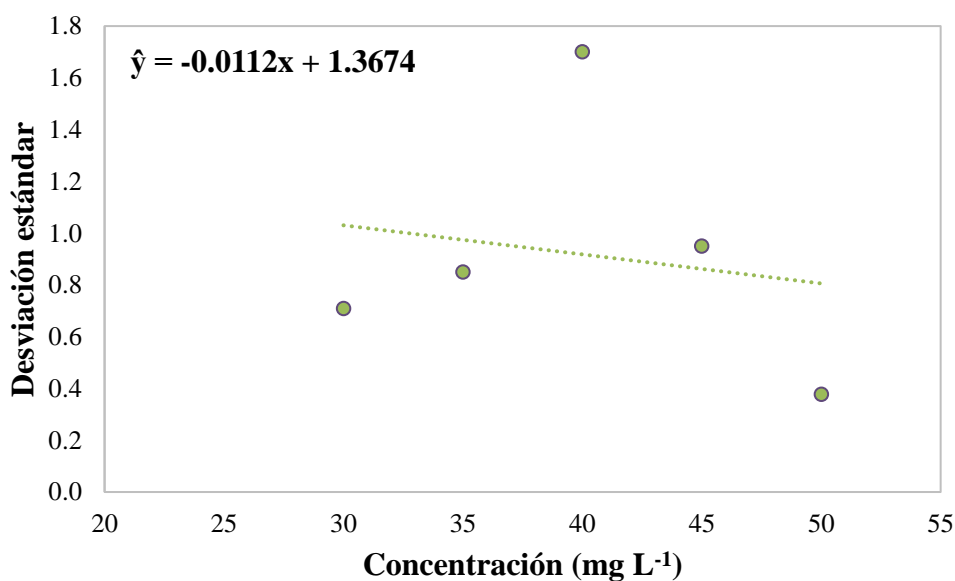


Figura 5. Gráfica que relaciona la desviación estándar y concentración de clorpirifos para el método de densitometría con TLC.

En la Figura 5, se construyó una recta que relaciona las desviaciones estándar de las áreas y las concentraciones del pesticida de 30, 35, 40, 45 y 50 mg L⁻¹, considerando que la desviación estándar de las respuestas S_{bl} corresponderá al valor de la ordenada de origen de la recta. A partir de las ecuaciones generadas en la Figura 4 y 5, LOD y LOQ se calcularon aplicando las fórmulas previamente descritas (Ecuación 1 y 2), obteniendo un valor de 2.9843 mg L⁻¹ para LOD y 5.0510 mg L⁻¹ de clorpirifos para LOQ, esto evidencia que el método presentó una adecuada capacidad analítica, permitiendo la cuantificación confiable de concentraciones superiores a 5.0510 mg L⁻¹ con un nivel apropiado de exactitud y precisión, empleando un volumen de muestra de 40 μ L por cada siembra.

3.2.5. Selectividad

Luego de haber determinado los valores de LOD y LOQ, posteriormente se procedió a evaluar la selectividad de la técnica de densitometría con TLC con el objetivo de verificar su capacidad para identificar al analito de interés frente a posibles interferencias presentes en la matriz de ajo. Para ello, se compararon los valores del R_f obtenidos para el estándar clorpirifos y su producto de degradación 2,3,5-tricloropiridina, con el fin de establecer que ambos compuestos presentan diferentes factores de retención y que de esta forma ambos se puedan diferenciar a pesar de estar estructuralmente relacionados. Por consiguiente, bajo las condiciones propias de la metodología planteada, se observó que el clorpirifos presentó un R_f de 0.51, mientras que el compuesto 2,3,5-tricloropiridina un valor ligeramente menor de 0.48. Si bien presentaron R_f similares, al momento de realizar la derivatización química con $AgNO_3$ 0.12M a una temperatura de 140°C, las bandas propias del pesticida clorpirifos desarrollaron un color amarillo mientras que el compuesto 2,3,5-tricloropiridina no presentó ningún cambio de color. Por lo tanto, este método demostró una selectividad analítica adecuada, garantizando que la detección y cuantificación del clorpirifos no se vean interferidas por la presencia de productos de degradación o compuestos coextraídos de la matriz de ajo.

3.2.6. Exactitud

Tras la evaluación de selectividad, se procedió a determinar la exactitud del método de densitometría con TLC. Este parámetro resultó útil ya que ayudó a confirmar la veracidad de las mediciones, especialmente en matrices vegetales como el ajo, donde la presencia de compuestos sulfurados puede interferir en la detección del pesticida. Para ello, se evaluó la exactitud a través del porcentaje de recuperación del pesticida a partir del método de extracción con hexano y *clean up* con florisil a un nivel de concentración de 40 mg L⁻¹.

Así también, se evaluó la muestra de ajo fortificada con 40 mg L⁻¹ estándar clorpirifos a partir del método de extracción con hexano y *clean up* con florisil y por último la muestra de ajo no fortificada con el fin de evaluar si en esta última muestra estaba presente el pesticida. Estas tres muestras se evaluaron a través de las metodologías descritas anteriormente en los apartados 2.2.2.1. y 2.2.2.2.

Tabla 5. Áreas correspondientes al parámetro de exactitud del método de densitometría con TLC.

N° de réplica	Áreas del pico		
	Estándar 40 mg L ⁻¹ *	Muestra de ajo fortificada con 40 mg L ⁻¹	Muestra de ajo no fortificada
1° réplica	70.8	68.0	< 5 %
2° réplica	68.1	67.2	< 5 %
3° réplica	70.1	66.7	< 5 %
Promedio	69.67	67.30	-
Desviación estándar	1.40	0.66	-
Concentración calculada	38.3270	37.1844	-
% Recuperación	95.82	92.96	-

* El estándar de 40 mg L⁻¹, hace referencia a la recuperación del estándar preparado a esa concentración a través del proceso de extracción y *clean up*.

La Tabla 5, presenta los resultados obtenidos de la evaluación del parámetro de exactitud, donde el porcentaje de recuperación para cada muestra cumple con el criterio establecido por la AOAC con un rango aceptable de recuperación de 80-110 % (Tabla 6). En cuanto al porcentaje de recuperación del estándar puro de clorpirifos 40 mg L⁻¹ fue de 95.82 % en promedio demostrando una buena eficiencia del proceso de extracción y limpieza en ausencia de la matriz. Respecto a la muestra fortificada con 40 mg L⁻¹ del pesticida, la recuperación del mismo fue del 92.96 %, confirmando que el método también es adecuado al aplicarse sobre matriz real. Sin embargo, se observó una ligera disminución del porcentaje de recuperación frente al estándar y esto puede atribuirse a interacciones con compuestos propios del ajo. Y en referencia a la muestra de ajo fortificada, no se detectó ninguna banda visible teniendo en cuenta que el límite de cuantificación para el método de densitometría con TLC fue de 5.0510 mg L⁻¹. Por lo tanto, estos resultados obtenidos evidencian que el procedimiento validado presenta una adecuada exactitud para la recuperación de clorpirifos en muestras de ajo confirmando así la eficiencia del proceso de extracción con hexano y posterior *clean up* en cartuchos de florisil.

Tabla 6. Valores aceptables del porcentaje de recuperación según la AOAC.

Concentración	Recuperación
100 %	98 – 102
10 %	98 – 102
1 %	97 – 103
0.1 %	95 – 105
100 mg/kg	90 – 107
10 mg/kg	80 – 110
1 mg/kg	80 – 110
100 ug/kg	80 – 110
10 ug/kg	60 – 115

* AOAC International (126).

3.3. Validación del método de HPLC

Las validaciones de la técnica de densitometría con TLC y el método de HPLC fueron evaluadas en simultáneo, donde las condiciones realizadas en el método de HPLC también resultaron ser favorables. Para tal fin, se empleó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y agua ultra-pura en una proporción de 60:40 respectivamente bajo un flujo constante de 2 mL/min y a una temperatura establecida de 25 °C en donde el pesticida clorpirifos presentó un tiempo de retención (t_R) de 11.4 minutos a una longitud de onda de 210 nm. Estas condiciones cromatográficas permitieron lecturas de picos definidos, lo que respalda la confiabilidad del método para la cuantificación del analito en bulbos de ajo

3.3.1. Linealidad

La linealidad del método fue el primer parámetro en ser evaluado mediante la construcción de tres curvas de calibración a partir de soluciones estándar de clorpirifos disueltas en acetonitrilo a concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹, las cuales presentaron un t_R de 11.4 minutos. Las señales obtenidas de este método se registraron como áreas de pico a una longitud de onda de 210 nm empleando una columna C18, la cual favoreció la retención del analito debido a su naturaleza apolar y las interacciones hidrofóbicas que se establecen con la fase estacionaria. En la Tabla 7 se observa el aumento proporcional entre la concentración del estándar y el área del pico demostrando un comportamiento lineal a lo largo del rango establecido bajo condiciones cromatográficas constantes.

Tabla 7. Áreas correspondientes al parámetro de linealidad del método de HPLC.

Concentración (mg L ⁻¹)	N° réplica (Área)			Promedio	Desviación estándar	CV
	1°	2°	3°			
0.5	3791	3745	3764	3767	23.12	0.61
1	7821	7891	7839	7850	36.35	0.46
2	16916	17193	17056	17055	138.50	0.81
3	25451	25478	25527	25485	38.53	0.15
4	34233	34299	34364	34299	65.50	0.19
5	43319	43260	43369	43316	54.56	0.13

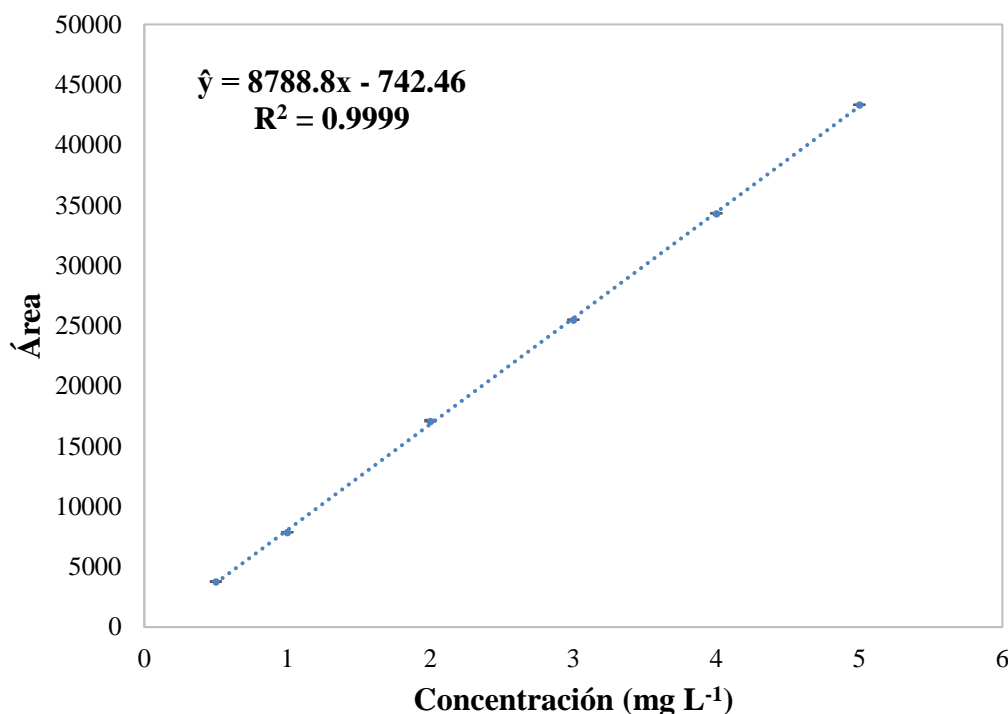


Figura 6. Curva de calibración para la evaluación de linealidad y repetibilidad del método de HPLC.

Así también para demostrar esta linealidad, se construyó una curva de calibración (Figura 6), la cual presentó un R de 0.9999 evidenciando un buen ajuste lineal. Es decir, existió una relación directamente proporcional entre las diferentes concentraciones del analito y la respuesta de medición registrada por el sistema HPLC siendo de importancia para continuar con la validación de los parámetros de precisión, selectividad, exactitud, límite de detección y cuantificación. Adicionalmente se acoplaron barras verticales que representan las desviaciones estándar, las cuales son apenas perceptibles debido a que las áreas medidas por el método de HPLC fueron de gran magnitud en comparación con las áreas obtenidas por la técnica de densitometría con TLC.

3.3.2. Precisión de repetibilidad

La precisión de repetibilidad constituye un parámetro crítico en la validación analítica ya que refleja la capacidad del método para generar resultados consistentes bajo condiciones idénticas de operación. Para su evaluación, al igual que en la técnica de densitometría con TLC, se emplearon los datos obtenidos por el parámetro de linealidad para los niveles de concentración analizados por el método de HPLC bajo las mismas condiciones. Es decir, en un mismo día, un solo analista y el empleo de los mismos estándares de clorpirifos a fin de minimizar variables externas del procedimiento. En la Tabla 7 se puede apreciar los valores obtenidos de CV para cada nivel de concentración, los cuales se encontraron por debajo de 7.3 %, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la AOAC para métodos cuantitativos (Tabla 3).

3.3.3. Precisión intermedia

Una vez establecida la linealidad y confirmada la repetibilidad del método, se procedió a evaluar la precisión intermedia. A diferencia del parámetro de repetibilidad evaluado anteriormente, en este caso se realizaron variaciones en las condiciones de trabajo como el empleo de diferentes instrumentos, preparación de nuevos estándares, mediciones en diferentes días, así como diferentes analistas. El propósito de estas variaciones fue verificar la estabilidad frente a cambios operativos habituales en un laboratorio, asegurando que los resultados obtenidos mantuvieran la confiabilidad y consistencia en escenarios reales de la aplicación de la técnica. La Tabla 8 presenta los valores de CV para el parámetro de precisión intermedia.

Tabla 8. Áreas correspondientes al parámetro de precisión intermedia del método de HPLC.

Concentración (mg L ⁻¹)	N° réplica (Área)				Promedio	Desviación estándar	CV
	1°	2°	3°	4°			
0.5	3815	3764	3745	3791	3778.8	30.66	0.81
1	7838	7839	7891	7821	7847.3	30.31	0.39
2	16986	17056	17193	16916	17037.8	118.23	0.69
3	24983	25527	25478	25451	25359.8	253.13	1.00
4	34277	34364	34299	34233	34293.3	54.57	0.16

La Tabla 8 presenta los resultados obtenidos, expresados como el porcentaje del coeficiente de variación (CV) para cada concentración de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ del estándar clorpirifos, las cuales fueron evaluadas en cuatro réplicas. Los valores obtenidos para la precisión intermedia fueron inferiores al 14.6 % cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la AOAC para métodos cuantitativos, esto demostró que el método de HPLC fue preciso para la cuantificación de clorpirifos en las condiciones analíticas establecidas.

3.3.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Posterior a la evaluación de los parámetros de linealidad, precisión intermedia y de repetibilidad, se determinaron los límites de detección y cuantificación del método HPLC, con el objetivo de establecer la mínima concentración de clorpirifos que se puede detectar y cuantificar de manera confiable dentro del rango validado. Ambos parámetros permiten asegurar que las señales analíticas registradas se encuentran por encima del umbral del ruido instrumental, garantizando así la confiabilidad de los resultados en términos de exactitud y precisión en cuanto a la cuantificación del pesticida clorpirifos en muestras de ajo. Los valores fueron calculados a partir de la ecuación de la curva de calibración (Figura 7) y la ecuación de la gráfica que relaciona la desviación estándar de las señales analíticas con los niveles de concentración evaluados (Figura 8), siguiendo los criterios establecidos por la AOAC. Con ambas ecuaciones de la recta se calcularon los límites de detección y cuantificación aplicando las fórmulas de la Ecuación 1 y 2 mencionadas anteriormente, los resultados fueron de 0.0415 mg L^{-1} y 0.0578 mg L^{-1} para LOD y LOQ respectivamente, lo cual indica que el método presentó una adecuada capacidad analítica. Es decir, por el método de HPLC se logró detectar concentraciones superiores a 0.0578 mg L^{-1} siendo relevante en el análisis de residuos en el bulbo de ajo, donde la presencia del pesticida puede encontrarse en cantidades pequeñas.

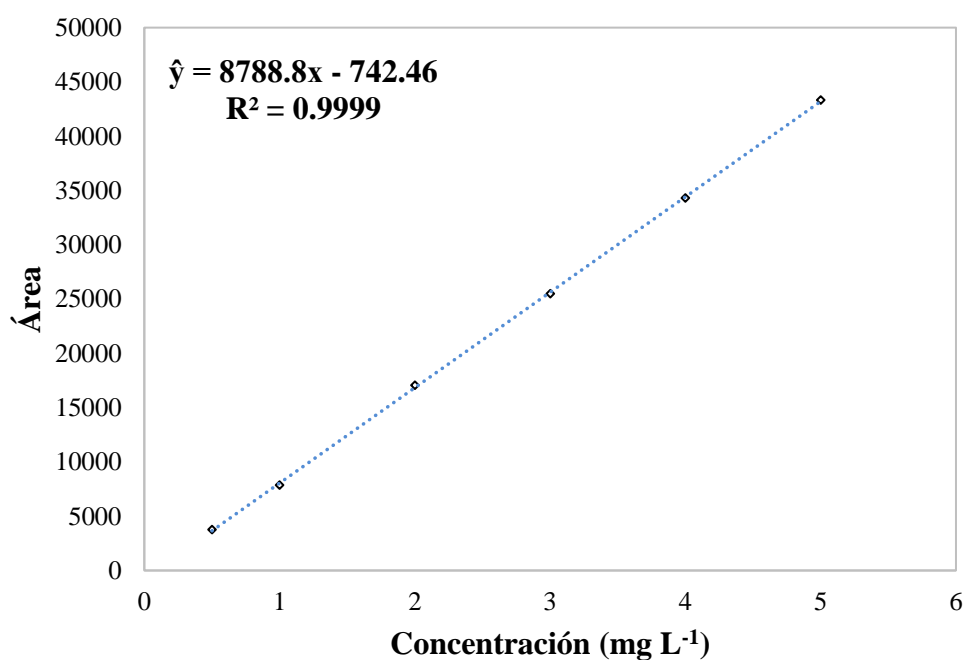


Figura 7. Gráfica empleada para la evaluación de LOD y LOQ del método de HPLC.

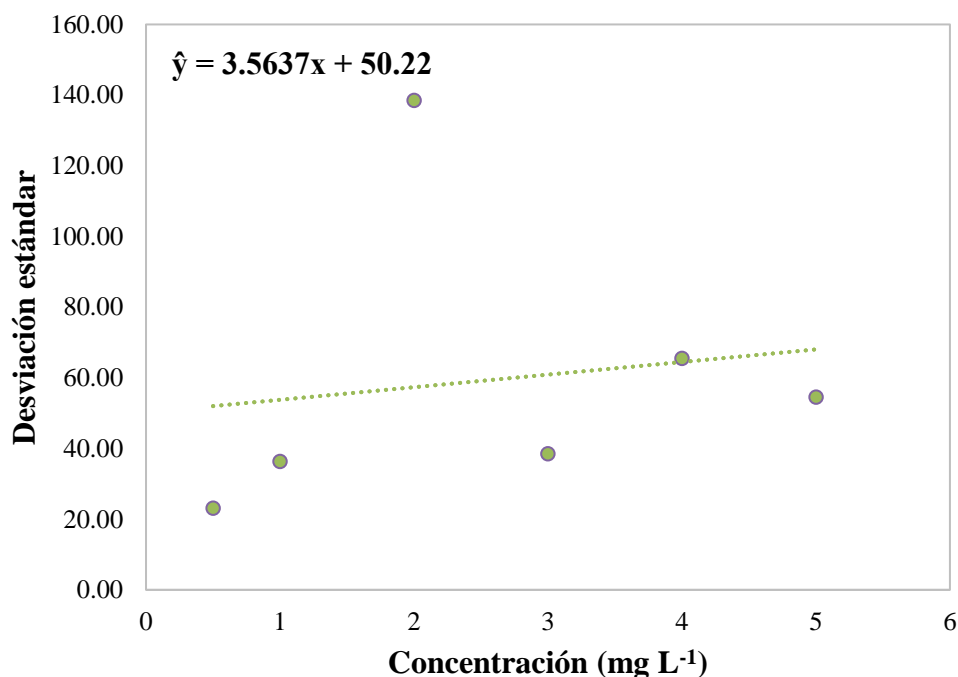


Figura 8. Gráfica que relaciona la desviación estándar y concentración de clorpirifos para el método de HPLC.

3.3.5. Selectividad

El parámetro de selectividad al igual que en el método de densitometría con TLC, se evaluó mediante el análisis de los tiempos de retención (t_R) del pesticida clorpirifos, así como de su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina con el fin de verificar la capacidad del sistema para distinguir de manera específica el clorpirifos frente a posibles interferencias propias de la matriz o productos de degradación del pesticida. Para ello, ambos compuestos fueron disueltos en acetonitrilo y analizados bajo las mismas cromatográficas, donde el compuesto 2,3,5-tricloropiridina presentó un t_R de 3.8 minutos mientras que el clorpirifos un t_R de 11.4 minutos. Esto permitió confirmar una adecuada selectividad del método, evidenciando su capacidad para distinguir el analito objetivo de su compuesto de degradación, el cual podría estar presente en la matriz.

3.3.6. Exactitud

La exactitud en el método HPLC se llevó a cabo de manera simultánea al procedimiento realizado para la técnica de densitometría con TLC, con el fin de comparar ambos métodos. Para tal objetivo, se evaluó mediante la técnica de adición estándar calculando el porcentaje de recuperación del estándar clorpirifos 4 mg L⁻¹, muestra de ajo fortificado con estándar clorpirifos 4 mg L⁻¹ y muestra de ajo no fortificada.

Los valores del porcentaje de recuperación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Áreas correspondientes al parámetro de exactitud del método de HPLC.

N° de réplica	Áreas del pico		
	Estándar 4 mg L ⁻¹	Muestra de ajo fortificada con 4 mg L ⁻¹	Muestra de ajo no fortificada * mg L ⁻¹
1° réplica	33616	32344	1190
2° réplica	33853	32093	1217
3° réplica	33765	31939	1164
Promedio	33744.7	32125.3	1190.3
Desviación estándar	119.80	204.43	26.50
Concentración calculada	3.9240	3.6043	0.2199
% Recuperación	98.10	90.11	-

*Muestra de ajo no fortificada, hace referencia a la muestra de ajo a la que no se añadió estándar clorpirifos.

La Tabla 9, presenta los resultados obtenidos durante la evaluación del parámetro de exactitud por el método de HPLC, donde la AOAC establece valores de recuperación por encima del 80 %. En cuanto a la recuperación del estándar puro de clorpirifos (4 mg L⁻¹), presentó un 98.10 % similar al valor de recuperación obtenido por el equipo densitométrico TLC Explorer. Por lo que se confirmó una excelente eficiencia del proceso de extracción y limpieza cuando se trabaja sin matriz interferente. Respecto a la muestra fortificada con 4 mg L⁻¹, la recuperación fue de 90.11 %, esto confirma que el método también fue adecuado al aplicarse sobre matriz real. Sin embargo, se observó una ligera disminución del porcentaje de recuperación en la muestra de ajo fortificada frente al porcentaje de recuperación del estándar, esto se puede atribuir a interacciones con compuestos propios del ajo. Para la muestra de ajo no fortificada se cuantificó un área de 1190.3 en promedio (t_R clorpirifos:11.4 minutos). Esta área se reemplazó en la ecuación de la curva de calibración y se calculó una concentración de 0.2199 mg L⁻¹, siendo oportuno resaltar que este valor de concentración no se detectó por el método de densitometría con TLC debido a que el valor de LOQ para este último método fue de 5.0510 mg L⁻¹.

3.4. Tratamiento de muestras

3.4.1. Recolección de muestras de ajo en mercados de la ciudad de Arequipa

Una vez concluido el proceso de validación de los métodos analíticos de densitometría con TLC y HPLC, se continuó con la etapa de análisis de clorpirifos en muestras de ajo reales obtenidas de diferentes mercados dentro de la ciudad de Arequipa.

Las validaciones realizadas fueron un paso esencial, ya que permitió asegurar que ambos métodos cumplieran con los criterios de linealidad, precisión, selectividad, exactitud, límite de detección y cuantificación establecidos por la AOAC garantizando de esta forma la fiabilidad de los resultados obtenidos en el análisis de muestras de ajo reales. Para la recolección de las muestras se realizó un muestreo aleatorio simple en 12 mercados representativos de distintas zonas de la ciudad de Arequipa, incluyendo tanto mercados mayoristas como minoristas. En cada mercado se adquirieron bulbos de ajo enteros, considerando variedades comerciales como el ajo Chino, Napurí, INIA 105 DONAJUS y el Arequipeño. Cada muestra fue registrada y codificada con el fin de preservar su trazabilidad, luego fueron transportadas en condiciones ambientales controladas al laboratorio para su posterior análisis.

3.6.2. Determinación de clorpirifos en ajo

Tras completar el proceso de extracción y limpieza para las 12 muestras de ajo recolectadas, cada extracto se analizó por ambos métodos en simultáneo. En el caso de la técnica de densitometría con TLC, no se logró detectar la presencia del pesticida clorpirifos en las muestras de ajo. No obstante, al analizar los resultados de las muestras de ajo procesadas por el método de HPLC, si se lograron cuantificar picos de clorpirifos con un t_R de 11.4 minutos en 6 de las 12 muestras de ajo que fueron analizadas (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de clorpirifos en muestras de ajo mediante análisis por HPLC.

Mercado	Tipo de mercado	Variedad	Concentración (mg L ⁻¹)	Concentración (mg clorpirifos/kg ajo)
Mercado Señor de Huanca	Mayorista	Ajo INIA 105 DONAJUS	0.8919	1.7832
Mercado Señor de Huanca	Mayorista	Ajo Chino	0.9766	1.9523
Mercado 4 de agosto	Minorista	Ajo Napuri	ND	ND
Mercado 4 de agosto	Minorista	Ajo Chino	ND	ND
Mercado Acomare	Mayorista	Ajo INIA 105 DONAJUS	3.9357	7.8676
Mercado Acomare	Mayorista	Ajo Arequipeño	0.4084	0.8163
Mercado Acomare	Mayorista	Ajo Napuri	3.7557	7.5055
Mercado Río Seco	Mayorista	Ajo Arequipeño	2.2719	4.5420
Mercado Río Seco	Mayorista	Ajo Napuri	ND	ND
Mercado Altiplano	Minorista	Ajo INIA 105 DONAJUS	ND	ND
Mercado Altiplano	Minorista	Ajo Napuri	ND	ND
Mercado Altiplano	Minorista	Ajo Chino	ND	ND

Por otra parte, para el método de densitometría con TLC se propuso una derivatización post cromatográfica con reactivo de nitrato de plata (0.12 M) disuelto en etanol 96 %, y para el desarrollo del color se colocaron las placas cromatográficas a una temperatura de 140°C en una hornilla eléctrica por 3 minutos para mejorar su visualización, transcurrido este tiempo solo la banda del primer carril donde se encontraba sembrado el estándar de clorpirifos desarrolló un color amarillo, mientras que en los otros carriles donde se sembraron las muestra no. Por lo tanto, la derivatización post cromatográfica en TLC resultó útil para las placas donde se sembraron las muestras de los ajos recolectados, ya que al ser visualizadas por el espectro UV-Visible a una longitud de onda de 254 nm, las bandas en cada carril presentaron un valor de R_f similar al estándar de clorpirifos. Sin embargo, cuando se sumergió la placa en nitrato de plata, las bandas no se colorearon del mismo tono que el estándar lo cual ayudó a descartar falsos positivos. Es decir, la derivatización compensó en cierta medida la baja resolución e interferencia de compuestos migratorios no deseables propios de la matriz (100). En cuanto al método de inmersión de las placas en una solución de reactivo produce una distribución más homogénea del reactivo sobre la superficie de la capa, lo que minimiza la influencia de los errores inherentes a la pulverización manual. Así mismo, el calentamiento de las placas (5-10 minutos de 100 a 120 °C) generalmente es necesario para una derivatización exitosa. Es por ello, que las placas con los estándares y muestras sembrados fueron inmersas en nitrato de plata, secadas al medio ambiente y posteriormente llevadas a una hornilla eléctrica a una temperatura de 140°C por 3 minutos para el desarrollo de color amarillo y así facilitar su identificación visual. Otros estudios reportaron el cloruro de paladio para la observación del pesticida clorpirifos en el espectro visible (92,154).

3.5. Análisis estadístico para comparar el método de densitometría con TLC y HPLC

Como parte del tratamiento estadístico para la comparación de los valores obtenidos por ambos parámetros, evaluaron los estadísticos F y t con el propósito de determinar si existían diferencias significativas entre la técnica de densitometría con TLC y el método de HPLC. La prueba F permitió contrastar la igualdad de varianza entre los métodos, mientras que la prueba t se utilizó para comparar las medias y establecer si las diferencias observadas eran estadísticamente relevantes.

3.5.1. Comparación del parámetro de linealidad

Para comparar el comportamiento del parámetro de linealidad en ambos métodos, se evaluó el coeficiente de correlación (R) realizando tres réplicas independientes por técnica.

Los valores obtenidos se muestran la Tabla 11 donde se observa que en todos los casos el coeficiente de correlación se mantuvo cercano a la unidad, lo que confirma la confiabilidad por parte de ambos métodos.

Tabla 11. Prueba *F* y *t* para la comparación del parámetro de linealidad en ambos métodos.

LINEALIDAD (R)	
Densitometría con TLC	HPLC
0.9991	0.9999
0.9991	0.9999
0.9978	0.9999
Prueba <i>F</i> : <i>P</i> -valor	0.0015
Prueba <i>t</i> : <i>P</i> valor ($\alpha=0.05$)	0.1014

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

La Tabla 11 presenta los valores de coeficiente de determinación (R) obtenidos para evaluar la linealidad del método de HPLC y densitometría con TLC en la determinación de clorpirifos. Este parámetro fue determinado a partir de curvas de calibración obtenidas a diferentes niveles de concentración del analito con el fin de comprobar la capacidad del método para generar una respuesta proporcional a la concentración del compuesto. Los valores del coeficiente de correlación (R) para la técnica de densitometría con TLC oscilaron entre 0.9978 y 0.9991, mientras que para el método de HPLC las tres curvas presentaron valores R de 0.9999, evidenciando que ambos métodos presentan una relación directamente proporcional entre la concentración del analito y la respuesta instrumental.

Para determinar si existían diferencias significativas entre ambos métodos, se aplicó primero la prueba *F*, el valor de *P* fue de 0.0015 menor al valor teórico, lo cual concluye que el coeficiente de correlación (R) calculado para los dos métodos son heterogéneos. Es decir, ambos métodos presentaron una dispersión diferente en cuanto a sus valores dentro del rango evaluado para cada uno. Sin embargo, esta diferencia en la varianza no necesariamente implica una diferencia en la media de los valores, por lo que se aplicó la prueba *t* para muestras con varianzas desiguales. El resultado de la prueba *t* presentó un valor *P* de 0.1014 mayor al valor teórico, lo cual demuestra que no existió diferencias estadísticamente significativas para el parámetro de linealidad en ambos métodos a un nivel de significancia de α igual a 0.05.

3.5.2. Comparación del parámetro de precisión de repetibilidad

Respecto a la evaluación del parámetro de precisión, se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia mediante el CV. Por ambos métodos se realizaron tres réplicas independientes para cada técnica, los valores obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Prueba *F* y *t* para la comparación del parámetro de precisión de repetibilidad en ambos métodos.

PRECISIÓN DE REPETIBILIDAD (CV)	
Densitometría con TLC	HPLC
1.35	0.61
1.35	0.46
2.34	0.81
1.14	0.15
0.40	0.19
	0.13
	Prueba <i>F</i> : <i>P</i> - valor 0.0382
	Prueba <i>t</i> : <i>P</i> - valor ($\alpha=0.05$) 0.0381

Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

La precisión de repetibilidad para ambos métodos se evaluó mediante el CV a partir de la curva de calibración obtenida del parámetro de linealidad. Es decir, ambas curvas fueron elaboradas bajo las mismas condiciones experimentales con un solo analista empleando los mismos estándares e instrumentos en un solo día con el propósito de evaluar la consistencia de las mediciones en un mismo día. En la Tabla 12 se observan que los valores de CV para el método de densitometría con TLC fluctuaron entre 0.4 y 2.3 % mientras que para el método de HPLC un rango de 0.1 a 0.9 % evidenciando una menor dispersión en las mediciones realizadas por HPLC. Así mismo, estos valores indican una adecuada repetibilidad del método ya que, según los criterios de aceptación de la AOAC, los valores deben ser inferiores a 7.3 %. No obstante, al aplicar la prueba *F*, se obtuvo un valor *P* de 0.0382 menor al valor teórico, lo cual demuestra que las varianzas de ambos métodos son heterogéneas y que la dispersión de los datos no es igual. Posteriormente, la prueba *t* para muestras con varianzas desiguales mostró un valor *P* de 0.0381 inferior también al valor crítico de 0.05, lo cual confirma que existen diferencias significativas a un nivel de significancia de α igual a 0.05 entre los valores de CV para el método de densitometría con TLC y HPLC. Estos resultados pueden deberse a las características inherentes de cada técnica, ya que la técnica de densitometría con TLC depende de procesos manuales (aplicación de muestras, desarrollo de la placa y lectura densitométrica) que implican ligeras variaciones en cuanto a su medición mientras que el método de HPLC emplea un sistema de inyección y detección automatizada, lo que reduce significativamente los errores operatorios.

3.5.3. Comparación del parámetro de precisión intermedia

Al igual que en el parámetro de repetibilidad, para la precisión intermedia también se calcularon los CV para cada nivel de concentración.

Sin embargo, para la evaluación de la precisión intermedia los ensayos se realizaron en diferentes días, con la preparación de nuevos estándares, diferentes instrumentos y analistas. En la Tabla 13, los valores para la técnica de densitometría con TLC variaron entre 0.7 y 2.2 % mientras que para el método de HPLC oscilaron entre 0.2 y 1.6 % evidenciando una buena variabilidad con valores inferiores a 14.6 % cumpliendo con las normativas de la AOAC.

Tabla 13. Prueba *F* y *t* para la comparación del parámetro de precisión intermedia en ambos métodos.

PRECISIÓN INTERMEDIA (CV)	
Densitometría con TLC	HPLC
2.11	0.81
1.14	0.39
1.91	0.69
1.07	1.00
0.99	0.16
	1.28
Prueba <i>F</i> : <i>P</i> - valor	0.2890
Prueba <i>t</i> : <i>P</i> - valor ($\alpha=0.05$)	0.0297
Nivel de significancia $\alpha=0.05$.	

Para la comparación estadística del parámetro de precisión intermedia se aplicó también la prueba *F* cuyo valor obtenido fue de 0.2890 mayor al valor teórico de 0.05 lo que indica que no hubo diferencias significativas entre las varianzas de los resultados reportados por ambos métodos. Posteriormente, se aplicó la prueba *t* para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los CV donde el valor *P* fue de 0.0297 menor al valor teórico de 0.05 demostrando que existieron diferencias significativas entre los valores del CV para la técnica de densitometría con TLC y el método de HPLC. Este comportamiento puede atribuirse a la naturaleza automatizada del HPLC, que permite mantener condiciones más controladas en cuanto a la inyección de las muestras, el flujo de la fase móvil minimizando errores de operación. Por el contrario, en la densitometría con TLC, las pequeñas variaciones en la aplicación del estándar o en la elución de las placas pueden generar leves fluctuaciones en la respuesta analítica, lo que se refleja en los valores de CV.

3.5.4. Comparación del parámetro de exactitud

Para la comparación del parámetro de exactitud se analizaron tres tipos de muestra: el estándar clorpirifos 40 mg L⁻¹, matriz de ajo fortificada con estándar clorpirifos 40mg L⁻¹ y la muestra de ajo no fortificada.

En donde la muestra de ajo fortificada permitió verificar la capacidad del método para recuperar el analito en presencia de la matriz, mientras que el control negativo sirvió para evaluar si la matriz no fortificada contenía al pesticida. Cada procedimiento de recuperación se evaluó por triplicado, en donde se observa que los valores fueron mayores al 80 % cumpliendo con el criterio de aceptación de la AOAC (Tabla 14 y 15).

Tabla 14. Prueba *F* y *t* para la comparación del parámetro de exactitud (recuperación del estándar clorpirifos) en ambos métodos.

RECUPERACIÓN ESTÁNDAR CLORPIRIFOS		
Densitometría con TLC (40 mg L ⁻¹)	HPLC (4 mg L ⁻¹)	
96.34	97.73	
93.93	98.41	
97.19	98.16	
	Prueba <i>F</i> : <i>P</i> - valor	0.0390
	Prueba <i>t</i> : <i>P</i> - valor ($\alpha=0.05$)	0.1490

Nivel de significancia $\alpha= 0.05$.

La Tabla 14 muestra la comparación del parámetro de exactitud en cuanto al porcentaje de recuperación del estándar clorpirifos, para el método de densitometría con TLC se evaluó a una concentración de 40 mg L⁻¹ y para el método de HPLC una concentración de 4 mg L⁻¹ obteniéndose un valor *P* de 0.0390 demostrando que las varianzas son heterogéneas. En consecuencia, se aplicó la prueba *t* para varianzas desiguales donde el valor *P* fue de 0.1490 mayor al valor teórico de 0.05 concluyendo que no existe diferencias significativas a un nivel de significancia de α igual a 0.05 entre el porcentaje de recuperación promedio obtenido por ambos métodos demostrando ser adecuados, precisos y confiables en condiciones controladas (en ausencia de matriz).

Tabla 15. Prueba *F* y *t* para la comparación del parámetro de exactitud (recuperación de ajo fortificado con estándar clorpirifos) en ambos métodos.

RECUPERACIÓN AJO FORTIFICADO CON CLORPIRIFOS		
Densitometría con TLC (40 mg L ⁻¹ en matriz de ajo)	HPLC (4 mg L ⁻¹ en matriz de ajo)	
93.81	90.73	
92.84	89.65	
92.24	89.94	
	Prueba <i>F</i> : <i>P</i> - valor	0.3323
	Prueba <i>t</i> : <i>P</i> - valor ($\alpha=0.05$)	0.0070

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

En cuanto a la técnica de densitometría con TLC se añadió una concentración de 40 mg L^{-1} y para el método de HPLC se añadió 4 mg L^{-1} . Como se puede observar en la Tabla 15, el valor P para la prueba F fue de 0.3323 demostrando que las varianzas son homogéneas. Para corroborar que no existe diferencia estadísticamente significativa, se realizó la prueba t donde el valor P fue de 0.0070 menor al valor teórico de 0.05 demostrando que a pesar de poseer varianzas homogéneas si existieron diferencias significativas a un nivel de significancia de α igual a 0.05 entre los valores del porcentaje de recuperación para TLC y HPLC. Esta diferencia se atribuye principalmente a la baja sensibilidad del método de densitometría con TLC, el cual no permitió detectar la presencia de clorpirifos en la muestra de ajo no fortificada. Sin embargo, por el método de HPLC si fue posible detectar y cuantificar el pesticida. Es por ello que para este último método se calculó la exactitud restando el área correspondiente a la muestra de ajo no fortificada del área obtenida del ajo fortificado resultando en un porcentaje menor de recuperación. Este procedimiento no pudo aplicarse al método de densitometría con TLC, dado que no se logró detectar ni cuantificar clorpirifos en el bulbo de ajo durante la evaluación del parámetro de exactitud. Por ende, con la evaluación estadística de este parámetro se concluye que el método de TLC al poseer valores más grandes de límite de cuantificación respecto al método de HPLC no logró cuantificar concentraciones menores a 5.0510 mg L^{-1} de clorpirifos en la muestra de ajo.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo validar y comparar la metodología de densitometría con TLC con el método de HPLC para la determinación del pesticida organofosforado clorpirifos empleando como matriz bulbos de ajo. La acumulación de este pesticida no solo puede dañar el medio ambiente sino también la salud de los humanos debido a su fácil acumulación y liposolubilidad. Diversas investigaciones han reportado el uso de métodos como cromatografía de gases (GS), cromatografía en capa fina (TLC), espectroscopía de masas y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para detectar plaguicidas en diferentes matrices (28,155).

La determinación del procedimiento para la cuantificación de un pesticida organofosforado se fundamenta en las propiedades del analito y la matriz, así como en el tiempo de detección, en la presencia de interferentes, la facilidad de preparación de la muestra, la factibilidad de la técnica de extracción siendo deseable procedimientos analíticos de bajo costo, selectivos, rápidos y sencillos para cuantificar pesticidas en alimentos (5). Es por ello, que se validó dos métodos como TLC y HPLC, el método de HPLC si bien es un método altamente sensible (5), suele ser costoso por el empleo de grandes volúmenes de solventes y requiere un largo tiempo de respuesta (156) mientras que el método de densitometría con TLC ofrece un rápido tiempo de análisis, de bajo costo y facilidad de uso (30,157) lo que lo convierte en un método ideal para la determinación de clorpirifos en bulbos de ajo. El método de densitometría con TLC se empleó para realizar el escaneo de bandas de clorpirifos bajo la luz UV para la validación del método, así como para la determinación de clorpirifos en las muestras de ajo a una longitud de onda de 254 nm. El equipo densitométrico TLC Explorer brindó áreas propias de cada banda, así como densitogramas, de este modo fue posible que la técnica de TLC sea cuantificable (158) destacando como una herramienta útil gracias a su relación costo-beneficio y simplicidad. Sin embargo, su rendimiento puede verse influenciado por una serie de factores como la composición de la fase móvil y la saturación de la cámara de revelado, la cual se ve influenciada por la temperatura y el tiempo (111). El factor de retención (R_f) por su parte es un valor adimensional que describe numéricamente la posición de una mancha en un cromatograma y se basa en el proceso de distribución de sustancias entre la fase estacionaria y la fase móvil (159). En esta investigación el análisis del pesticida organofosforado en TLC brindó un R_f de 0.51 en promedio empleando como fase móvil ciclohexano y cloroformo (40:60), un tiempo de saturación de 30 minutos para un tamaño de placa de 6 cm de largo y 5 cm de ancho.

Según una investigación realizada por Gonzales et al. (92) “*Development of a rapid method for the quantification of methamidophos and chlorpyrifos by Thin Layer Chromatography in soils using image processing*”, analizaron y determinaron clorpirifos en muestras de suelos agrícolas de ajo y cebolla empleando el método de TLC y una posterior cuantificación de las bandas por el Software ImageJ, a través de su metodología reportó un R_f de 0.83 para clorpirifos. Las condiciones bajo las que se realizó fueron en un tamaño de placa de 10 cm de largo, en una fase móvil de ciclohexano:cloroformo (40:60) y un tiempo de saturación de la cámara cromatográfica de 15 minutos. Así mismo, Ramírez et al. (160) presentaron un trabajo “*Estudio preliminar para la determinación de plaguicidas en vegetales comercializados en una zona de Michoacán (México)*”, donde ensayaron con muestras vegetales para la determinación de clorpirifos usando como fase móvil hexano y acetona (80:20), el valor de R_f fue de 0.75 con un volumen de carga de 10 μ L. Adicionalmente, Khan et al. (154) en el estudio llamada “*Evaluation of TLC (Thin Layer Chromatography) Methods for Pesticide Residue Analysis*” reportaron diferentes valores de R_f para clorpirifos de 0.65, 0.69 y 0.77, cada uno de estos valores dependía de la fase móvil las cuales fueron etil acetato, diclorometano y óxido de aluminio con acetato de etilo respectivamente. El tiempo de saturación, así como el tamaño de la placa fueron validados a 30 minutos y en placas de 10 cm de largo. Sherma (161) en su investigación “*Recent Advances in the Thin-Layer Chromatography of Pesticides: A Review*”, informó acerca de un valor de R_f de 0.93 reportado en la determinación de clorpirifos con una fase móvil de hexano y etil acetato en una proporción de 30:70 respectivamente. Las variaciones en los valores reportados del factor de retención (R_f) dependen en gran medida de la fase móvil que se emplee, así como del volumen de muestra cargada y el tiempo de saturación de la cámara cromatográfica. Igualmente, el volumen de siembra es importante para mejorar la eficiencia de separación por TLC. Este objetivo se puede lograr aplicando volúmenes de muestra de 1 a 5 μ L en TLC, sin embargo, cuando la concentración de soluto es muy baja, se debe utilizar un volumen de siembra considerablemente mayor. Por lo tanto, en este trabajo se empleó un volumen de 40 μ L con el fin de garantizar una concentración suficiente para cada lectura y así realizar su posterior cuantificación por el equipo densitométrico TLC Explorer.

En cuanto a la derivatización post cromatográfica en TLC, también resultó ser otra herramienta de gran importancia, ya que ayudó a distinguir al pesticida clorpirifos con el posterior desarrollo de un color amarillo. Esto se debe a la interacción entre el nitrato de plata con los átomos de cloro presentes en la estructura del clorpirifos dando lugar a un nuevo compuesto cloruro de plata, un sólido blanquecino que se precipita sobre la fase estacionaria.

Sin embargo, al emplear temperatura se cataliza la reducción térmica del cloruro de plata en partículas de plata metálica tornándose de esta forma de un color amarillento o pardo. Gonzales et al. (92) así como Khan et al. (154) emplearon también una derivatización con nitrato de plata mientras que Sherma (161) por su parte mencionó el empleo de vapor de yodo para su coloración visible.

Por otra parte, en cuanto a la validación del método de HPLC el tiempo de retención (t_R) fue un término de importancia debido a que permitió a identificar al pesticida clorpirifos en los bulbos de ajo examinados. Para lograr tal identificación, las corridas cromatográficas se realizaron bajo una elución isocrática, es decir a un flujo constante de 2 mL/min en una columna RP18 de 5 μ m de tamaño de partícula y dimensiones de 250 mm \times 4.6 mm, a una temperatura de 25°C y empleando como fase móvil acetonitrilo:agua (v/v) en una proporción de 60:40 respectivamente obteniendo un tiempo de retención de 11.4 minutos para clorpirifos. Mauldin et al. (162) en su investigación “*A Simple HPLC Method for the Determination of Chlorpyrifos in Black Oil Sunflower Seeds*”, realizaron una cuantificación de clorpirifos en semillas de girasol empleando una columna de fase reversa C18 de 5 μ m de tamaño de partícula (dimensiones de 250 mm \times 4.6 mm) con una fase móvil (v/v) de acetonitrilo y solución de ácido fosfórico en una proporción de 75:25 respectivamente, a una longitud de onda de 230 nm y un flujo de 1 mL min⁻¹ obteniendo un tiempo de retención de 15 minutos. En otro estudio “*Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative determination of chlorpyrifos*”, reportaron un tiempo de retención del clorpirifos a los 2.5 y 3.8 minutos en una columna reversa C18 de 5 μ m (250 mm \times 4.6 mm) con una mezcla de fase móvil (v/v/v) de acetonitrilo:agua:ácido acético glacial (90:10:0.1) a una longitud de onda de 230 nm y un flujo de 1 mL min⁻¹ (163). Un tiempo de retención similar reportó Gonzáles (164) en su investigación “*Procedimiento Simple Y Rápido de Extracción Asistida por Ultrasonido para la Determinación de Clorpirifós y Profenofós en Suelos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución*”, de 2.9 y 4.6 minutos empleando una columna RP 18e (4.6 \times 100 mm), fase móvil (v/v) acetonitrilo:agua (60:40), flujo de 2 mL min⁻¹ y longitud de onda de 205 nm. Por otro lado, Quenguan et al. (165) en su estudio “*Determinación de plaguicidas organofosforados y carbamatos en agua para consumo humano del departamento de Nariño mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-VWD)*”, emplearon una columna C18 de 5 μ m (250 mm \times 4.6 mm) donde el clorpirifos presentó diferentes tiempos de retención con valores que oscilaban desde los 7 hasta los 17 minutos debido a la variación de las proporciones estudiadas de la fase móvil de acetonitrilo:agua, así como de la longitud de onda y el flujo (mL/min).

Es decir, los diferentes valores reportados acerca del tiempo de retención (t_R) del pesticida clorpirifos en el HPLC, varían de acuerdo con el flujo, la composición de fase móvil y la fase estacionaria, así como de las dimensiones de la columna cromatográfica y la longitud de onda al cual el clorpirifos presenta una mayor absorción.

En cuanto a la validación de ambas metodologías, cada parámetro fue evaluado de manera simultánea pero analizado de manera independiente, es decir para la técnica de densitometría con TLC, las concentraciones estudiadas fueron de 30, 35, 40, 45 y 50 mg L⁻¹ donde la relación entre las áreas de los picos y las concentraciones demostraron tener un buen ajuste lineal con un coeficiente de correlación (R) de 0.9999, así también presentó una adecuada precisión, ya que se obtuvieron valores de CV inferiores al 7.3 % para el parámetro de precisión de repetibilidad y valores de CV menores al 14.6 % para el parámetro de precisión intermedia. Con referencia a los valores de LOD y LOQ estos fueron de 2.9843 y 5.0510 mg L⁻¹ respectivamente, así también se logró una buena selectividad del clorpirifos respecto a su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina y finalmente en la evaluación del parámetro de exactitud, se obtuvieron valores de recuperación mayores al 80 % cumpliendo de aceptación de la AOAC. Por otro, lado en el método de HPLC se evaluaron concentraciones de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹, donde la curva de calibración también presentó una adecuada validación analítica con R de 0.9999 y valores de CV inferiores a 7.3 % y 14.6 % para el parámetro de repetibilidad y precisión intermedia respectivamente. Así también el valor de LOD para el rango estudiado fue de 0.0415 y 0.0578 mg·L⁻¹ para el valor de LOQ, lo que demostró una mayor sensibilidad frente a la técnica de densitometría con TLC. En cuanto a la selectividad, el HPLC permitió una separación clara con un t_R de 11.4 minutos para clorpirifos y 3.8 minutos para 2,3,5-tricloropiridina garantizando de esta forma la identificación del analito en presencia de interferencias estructuralmente relacionadas. Respecto a la exactitud, también se obtuvieron valores de recuperación superiores al 80 % cumpliendo con las normas establecidas por la AOAC.

En cuanto a la comparación de los parámetros de ambos métodos de TLC y HPLC, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros de linealidad y exactitud. Sin embargo, en cuanto a los parámetros de precisión de intermedia y de repetibilidad, a pesar de que ambos métodos presentaban valores de coeficiente de variación menores a 14.6 y 7.3 % respectivamente, existieron diferencias significativas. En estudios similares, Bahgat et al. (166) reportaron valores similares, es decir valores de R² de 0.9998 para la técnica de densitometría con TLC y 0.9999 para el método de HPLC, así como coeficientes de variación menor a 2 % para ambas metodologías.

De acuerdo con la prueba t y F no presentaron diferencias significativas. Ahmed et al. (167) en su investigación comparativa, ambos métodos presentaron un R^2 de 0.9999 y coeficientes de variación menor a 2 % no existiendo diferencias significativas. Así mismo, Nessiem et al. (157) compararon también ambos métodos de HPLC y densitometría con TLC para la separación quiral de isómeros de besilato de atracurio, concluyendo que no existían diferencias significativas en la evaluación de los parámetros de exactitud y precisión. Adicionalmente, Adamczuk et al. en su estudio, compararon también ambos métodos para la cuantificación de antocianinas en frambuesa y sus resultados demostraron que cada método puede emplearse indistintamente. En cuanto a los valores del límite de cuantificación, debido a que el método de densitometría con TLC presentó valores de LOQ más altos, no permitió la determinación cuantitativa del analito a concentraciones por debajo de 5.0510 mg L^{-1} . Sin embargo, resultó ser una alternativa más económica, ya que requirió un equipo especializado mínimo y menos laborioso permitió un análisis más rápido de muestras simultáneamente en poco tiempo lo que la hace potencialmente un método más aplicable (158). Por ende, los resultados de estas investigaciones demuestran que el método de densitometría con TLC para diferentes matrices presenta una buena precisión de resultados, así como valores aceptables de coeficiente de correlación (R) al igual que el HPLC cumpliendo con las directrices de la AOAC para métodos cuantitativos. En contraste, el HPLC, si bien ofrece una alta sensibilidad y precisión, el empleo de reactivos y el mantenimiento del propio equipo resulta ser costoso, así como el tiempo que conlleva cada análisis en comparación con el método de TLC (168). Walily et al. (169), también sugirieron que el método de densitometría con TLC propuesto resultó simple, rápido, requirió volúmenes mínimos de solventes y también presentó como ventaja el análisis de varias muestras al mismo tiempo sin comprometer la precisión, por lo que el método es adecuado para laboratorios de control de calidad, donde la economía y el tiempo son esenciales.

Con relación a la cuantificación propiamente dicha del clorpirifos en los ajos muestreados de 12 mercados de la ciudad de Arequipa, se reportó por el método de HPLC la presencia de este pesticida en 6 mercados (50 % de muestras), los cuales presentaban concentraciones que van desde 0.4084 hasta 3.9357 mg L^{-1} de clorpirifos. Por el método de densitometría con TLC, no se lograron visualizar estas concentraciones ya que el LOQ era por encima de 5.0510 mg L^{-1} , lo cual impidió su detección y cuantificación. Según la trazabilidad documentada, los ajos que contenían este pesticida fueron cosechados en Tiabaya, Chivay, Tambo, Polobaya y en la propia ciudad de Arequipa. Estos valores son de particular relevancia ya que demuestran que a pesar de la restricción del empleo y venta de clorpirifos en el Perú vigente desde el año 2023, su uso persiste en las cosechas de ajo dentro de la ciudad Arequipa.

Purnama et al. (170) en su investigación “*Multiple pesticide residues in rice and chlorpyrifos persistence in peat soils*”, reportó presencia de clorpirifos en 21 de 40 cultivos de arroz (48,7%) que fueron muestreados en la provincia de Riau, Indonesia a pesar de que en el país su uso se encuentra prohibido. Las concentraciones oscilaron entre 0,002 y 0,100 mg clorpirifos/kg arroz, así mismo evaluaron la persistencia de clorpirifos en los suelos lo cual evidenció que a pesar de no haberse empleado el pesticida durante más de un año, las tierras seguían impregnadas de clorpirifos. Su retención a largo plazo se debe al entorno elevado en materia orgánica y condiciones hidrológicas facilitando así a su absorción por las plantas y la contaminación de aguas subterráneas. Lo que refleja un uso indebido y una consecuente repercusión negativa en la salud humana y el medio ambiente. En cuanto a la presencia de un pesticida no sistémico en un cultivo, se sabe que este tipo de pesticidas como el clorpirifos, son de carácter lipofílico y se absorben en la cutícula cerosa de las plantas. La penetración en los tejidos de la planta (frutos, hojas o raíces) es mínima para esta clase de pesticidas, es decir no pueden translocarse. Sin embargo, en un estudio propuesto por Łozowicka et al. (73), “*Systemic and non-systemic pesticides in apples from Kazakhstan and their impact on human health*”, reportaron la presencia de pesticidas no sistémicos en manzanas, donde el clorpirifos presentaba una concentración de 0.425 mg clorpirifos/kg manzana.

Es decir, el mecanismo de esta investigación y el reporte de sus resultados se concreta a través de la adsorción cuticular o penetración a través de la cera, epicuticular y posteriormente la cutícula siendo la concentración del ingrediente activo y el carácter lipofílico, factores que impulsan la transferencia. En contraste con los resultados de esta investigación, si bien la continuidad del empleo de clorpirifos por parte de los agricultores es un factor directo, no se descarta la idea de la persistencia residual del pesticida en el medio ambiente ya que debido al extenso periodo de uso, es probable que el clorpirifos se mantenga en el ecosistema agrícola incluso después de la interrupción de su aplicación, ya sea por la presencia del clorpirifos en tierras donde han sido aplicados anteriormente o por aguas contaminadas con el propio pesticida.

CONCLUSIONES

1. Se validó la técnica de densitometría con TLC, donde se obtuvo un valor R de 0.9987 y R^2 de 0.9998 en promedio, valores de CV inferiores 14.6 % para el parámetro de precisión intermedia y valores menores a 7.3 % para repetibilidad, también presentó un LOD de 2.9843 mg L⁻¹ y un LOQ de 5.0510 mg L⁻¹. En cuanto al parámetro de selectividad, se observaron diferentes valores de R_f de 0.51 para clorpirifos y 0.48 para el compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina. Así mismo, el porcentaje de recuperación del pesticida fue mayor al 80 % consolidando su validez para el análisis de clorpirifos en bulbos de ajo.
2. Se validó el método de HPLC, obteniendo un R de 0.9999 y R^2 de 0.9999 en promedio, valores de CV menores a 14.6 % para el parámetro de precisión intermedia e inferiores a 7.3 % para la repetibilidad. Respecto a la sensibilidad, el valor para LOD fue de 0.0415 mg L⁻¹ y para LOQ 0.0578 mg L⁻¹, en el parámetro de selectividad, el método de HPLC mostró una mejor separación del clorpirifos y el compuesto 2,3,5-tricloropiridina con un t_R de 11.4 y 3.8 minutos respectivamente. Así también, el porcentaje de recuperación del pesticida fue mayor al 80 % confirmando su aplicabilidad para el análisis de clorpirifos en bulbos de ajo.
3. La comparación entre ambos métodos se realizó mediante la aplicación de dos pruebas estadísticas, la prueba F y t , donde se obtuvieron valores P de 0.0297 para la precisión intermedia, 0.0381 para repetibilidad y 0.0070 para el parámetro de exactitud existiendo diferencias significativas. Por el contrario, en cuanto a la comparación del parámetro de linealidad no hubieron diferencias significativas con un valor P de 0.1014, lo que confirma que ambos métodos fueron validados correctamente bajo condiciones controladas, pero poseen distintas capacidades analíticas.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar una técnica para límites de cuantificación menores a 5 mg L⁻¹ para la determinación de trazas de clorpirifos en muestras de ajo.
- Desarrollar la aplicabilidad del método propuesto de extracción de clorpirifos y limpieza en matrices similares taxonómicamente al bulbo de ajo y de gran importancia comercial dentro de la ciudad de Arequipa, como la cebolla.
- Dado que se hallaron concentraciones de clorpirifos en bulbos de ajo en un rango de 0.4084 a 3.9357 mg.L⁻¹ por el método de HPLC, se sugiere el monitoreo periódico de residuos de clorpirifos en campo dentro de la ciudad de Arequipa, antes de su ingreso a la cadena de comercialización.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibrahim S, Gupta RK, War AR, Hussain B, Kumar A, Sofi T, et al. Degradation of chlorpyrifos and polyethylene by endosymbiotic bacteria from citrus mealybug. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2025 Jul 14];28(6):3214–24. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S1319562X21002308>
2. Rathod AL, Garg RK. Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: A forensic perspective with reference to Indian scenario. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2025 Jul 14]; 47:29–34. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S1752928X17300173>
3. Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong M, et al. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Jul 14]; 135:387–93. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0045653515004877>
4. Wang L, Liu Z, Zhang J, Wu Y, Sun H. Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults: Metabolic characteristic, exposure estimation, and potential effect of oxidative damage. *Environ Res* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Jul 14]; 149:164–70. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0013935116301839>
5. Zhang L, Yu R, Zhou M, Wang C, Zhang D, Ren W, et al. Ionic liquid-based cloud point extraction five organophosphorus pesticides in coarse cereals. *Food Chem* [Internet]. 2022 Jun 15 [cited 2025 Jul 14]; 379:132161. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814622001224>
6. Narendran ST, Meyyanathan SN, Babu B. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 Jul 14]; 133:109141. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0963996920301666>
7. Wu M, Yi J, Yin C, Sun Q, Gao L, Niu N, et al. An upconversion nanosensor with phenolic-like functionality for accurate identification of chlorpyrifos in grapes. *Food Chem* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Jul 14]; 416:135859. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308>

- 814623004764
8. Boontongto T, Burakham R. Eco-friendly fabrication of a magnetic dual-template molecularly imprinted polymer for the selective enrichment of organophosphorus pesticides for fruits and vegetables. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2021 Nov 22 [cited 2025 Jul 14]; 1186:339128. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0003267021009545>
 9. Kaushal J, Khatri M, Arya SK. A treatise on Organophosphate pesticide pollution: Current strategies and advancements in their environmental degradation and elimination. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 Jul 14]; 207:111483. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0147651320313208>
 10. Ajiboye TO, Oladoye PO, Olanrewaju CA, Akinsola GO. Organophosphorus pesticides: Impacts, detection and removal strategies. *Environ Nanotechnol Monit Manag* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 Jul 14]; 17:100655. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S2215153222000150>
 11. Nandi NK, Vyas A, Akhtar MJ, Kumar B. The growing concern of chlorpyrifos exposures on human and environmental health. *Pestic Biochem Physiol* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Jul 14];185: 105138. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0048357522001055>
 12. Tabibi A, Jafari MT. High efficient solid-phase microextraction based on a covalent organic framework for determination of trifluralin and chlorpyrifos in water and food samples by GC-CD-IMS. *Food Chem* [Internet]. 2022 Mar 30 [cited 2025 Jul 14];373: 131527. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814621025334>
 13. Xu L, Zhang X, Abd El-Aty AM, Wang Y, Cao Z, Jia H, et al. A highly sensitive bio-barcode immunoassay for multi-residue detection of organophosphate pesticides based on fluorescence anti-quenching. *J Pharm Anal* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Jul 14];12(4):637–44. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2095177922000454>
 14. Ore OT, Adeola AO, Bayode AA, Adedipe DT, Nomngongo PN. Organophosphate pesticide residues in environmental and biological matrices: Occurrence, distribution and potential remedial approaches. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Jul 14]; 5:9–23. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2590182622000236>

15. Kumaran A, Vashishth R, Singh S, U S, James A, Velayudhaperumal Chellam P. Biosensors for detection of organophosphate pesticides: Current technologies and future directives. *Microchemical Journal* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Jul 14]; 178:107420. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0026265X2200248X>
16. Zhang C, Jiang Z, Jin M, Du P, Chen G, Cui X, et al. Fluorescence immunoassay for multiplex detection of organophosphate pesticides in agro-products based on signal amplification of gold nanoparticles and oligonucleotides. *Food Chem* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 Jul 14]; 326:126813. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814620306750>
17. Wu X, Ding Z. Evaluation of matrix effects for pesticide residue analysis by QuEChERS coupled with UHPLC-MS/MS in complex herbal matrix. *Food Chem* [Internet]. 2023 Mar 30 [cited 2025 Jul 14]; 405:134755. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814622027170>
18. Villaverde JJ, Sevilla-Morán B, López-Goti C, Alonso-Prados JL, Sandín-España P. Trends in analysis of pesticide residues to fulfil the European Regulation (EC) No. 1107/2009. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2025 Jul 14]; 80:568–80. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0165993615301916>
19. Gonçalves-Filho D, Silva CCG, De Souza D. Pesticides determination in foods and natural waters using solid amalgam-based electrodes: Challenges and trends. *Talanta* [Internet]. 2020 May 15 [cited 2025 Jul 14]; 212:120756. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0039914020300473>
20. Dhall RK, Cavagnaro PF, Singh H, Mandal S. History, evolution and domestication of garlic: a review. *Plant Systematics and Evolution* [Internet]. 2023 Oct 1 [cited 2025 Jul 14]; 309(5):1–16. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/article/10.1007/s00606-023-01869-9>
21. Kang S, Li L, Ren X, Zhang M, Li W, Chen Z. Occurrence and fate characteristics of isoproturon from garlic cultivation to household processing: Implication for human exposure. *J Hazard Mater* [Internet]. 2023 Apr 15 [cited 2025 Jul 14]; 448:130936. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0304389423002182>

22. Zafar S, Aslam N, Zia-Ul-haq M, Perveen S, Iqbal N. Garlic. Essentials of Medicinal and Aromatic Crops [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Jul 14];459–82. Available from: https://link-springer-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/chapter/10.1007/978-3-031-35403-8_18
23. Li L, Zhang Y, Liu R, Shi R, Xiao Z, Li S, et al. Analysis of sulfides in garlic of different origins based on UPLC-QTOF-MS and HPLC combined with chemometrics. Journal of Food Composition and Analysis [Internet]. 2025 Jan 1 [cited 2025 Jul 14]; 137:106974. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0889157524010081>
24. Ministerio de Agricultura y Riego. El ajo en el contexto mundial y nacional [Internet]. 2020 Mar [cited 2025 Jul 15]. Available from: https://www.inia.gob.pe/wp-content/uploads/2020/04/El_Ajo_MercadoMundial.pdf
25. Shagun S, Bains A, Sridhar K, Dhull SB, Patil S, Gupta VK, et al. A comprehensive review on impact of post-harvest management and treatment practices on the quality of garlic (*Allium sativum* L) during storage. Sci Hortic [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Jul 15]; 337:113586. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0304423824007404>
26. Liu S, Yuan L, Yue X, Zheng Z, Tang Z. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate Pesticide Detection. Advanced Powder Technology [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2025 Jul 15];19(5):419–41. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0921883108609193>
27. Olisah C, Human LRD, Rubidge G, Adams JB. Organophosphate pesticides sequestered in tissues of a seagrass species - *Zostera capensis* from a polluted watershed. J Environ Manage [Internet]. 2021 Dec 15 [cited 2025 Jul 15]; 300:113657. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0301479721017199>
28. Karadurmus L, Cetinkaya A, Kaya SI, Ozkan SA. Recent trends on electrochemical carbon-based nanosensors for sensitive assay of pesticides. Trends in Environmental Analytical Chemistry [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Jul 15]; 34: e00158. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/abs/pii/S2214158822000058>
29. EPA. Acetonitrile CAS NO. 75-05-8 [Internet]. 1994 [cited 2025 Oct 20]. Available from: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/910186U0.PDF?Dockey=910186U0.PDF>
30. Shao Y, Wang M, Cao J, She Y, Cao Z, Hao Z, et al. A method for the rapid determination of pesticides coupling thin-layer chromatography and enzyme inhibition

- principles. *Food Chem* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Jul 15]; 416:135822. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814623004399#b0090>
31. Quiroga Pablo. Cromatografía en capa fina (TLC) [Internet]. [cited 2025 Jul 15]. p. 73–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977006191>
 32. Gunawan AP, Utama DN. Decision support model to assess pesticide safeness toward environment. *Environ Anal Health Toxicol* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 Jul 15];39(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38631395/>
 33. Ficha de requisitos técnicos de acceso al mercado de EE.UU [Internet]. 2009 Jul [cited 2025 Jul 15]. Available from: <http://www.minag.gob.pe/hortalizas-y-legumbres/fichas-tcnicas.html>
 34. Hezakiel HE, Thampi M, Rebello S, Sheikhmoideen JM. Biopesticides: a Green Approach Towards Agricultural Pests. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 Jul 15];196(8):5533–62. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/article/10.1007/s12010-023-04765-7>
 35. Prasad B, Sharma D, Kumar P, Chandra Dubey R. Biocontrol potential of *Bacillus* spp. for resilient and sustainable agricultural systems. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2023 Nov 1;128.
 36. Zhou W, Li M, Achal V. A comprehensive review on environmental and human health impacts of chemical pesticide usage. *Emerg Contam*. 2025 Jan 1;11(1).
 37. Nuruzzaman M, Bahar MM, Naidu R. Diffuse soil pollution from agriculture: Impacts and remediation. *Science of the Total Environment*. 2025 Jan 25;962.
 38. Yu H, Wang M, Cao J, She Y, Zhu Y, Ye J, et al. Dual-mode detection of organophosphate pesticides in pear and Chinese cabbage based on fluorescence and AuNPs colorimetric assays. *Food Chem* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Jul 15]; 364:130326. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0308814621013327>
 39. Battaglin WA, Meyer MT, Kuivila KM, Dietze JE. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J Am Water Resour Assoc*. 2014;50(2):275–90.
 40. Wu M, Zhang W, Miao J, Sun C, Wang Q, Pan L. Pyrethroids contamination and health risk assessment in seafood collected from the coast of Shandong, China. *Mar Pollut Bull*. 2023 Jan 1;186.

41. Deng F, Sun J, Dou R, Yu X, Wei Z, Yang C, et al. Contamination of pyrethroids in agricultural soils from the Yangtze River Delta, China. *Science of the Total Environment*. 2020 Aug 20;731.
42. Ghosh G. Graphene oxide-nanocomposite-based electrochemical sensors for the detection of organophosphate pesticides. *Sensing of Deadly Toxic Chemical Warfare Agents, Nerve Agent Simulants, and their Toxicological Aspects* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Jul 16];635–58. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/B9780323905534000093>
43. Sud D, Kaur P, Bansal P. High-performance liquid chromatographic techniques for determination of organophosphate pesticides in complex matrices. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Analytical Techniques for Environmental and Industrial Analysis* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 Jul 16];175–96. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/B9780128218839000060>
44. Zhang C, Li S, Duan Z, Li Q, Zhao M, Chen Y, et al. Water-soluble non-conjugated polymer dots with strong green fluorescence for sensitive detection of organophosphate pesticides. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2022 May 8 [cited 2025 Jul 16]; 1206:339792. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0003267022003634>
45. Ma D, Liu J, Liu H, Yi J, Xia F, Tian D, et al. Multiplexed electrochemical aptasensor based on mixed valence Ce (III, IV)-MOF for simultaneous determination of malathion and chlorpyrifos. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2022 Oct 16 [cited 2025 Jul 16]; 1230:340364. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0003267022009357>
46. Patel H, Rawtani D, Agrawal YK. A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase- a review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2025 Jul 16]; 85:78–91. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0924224418302930>
47. Elencovan V, Yahaya N, Raoov M, Zain NNM. Exploring a novel silicone surfactant-based deep eutectic solvent functionalized magnetic iron particles for the extraction of organophosphorus pesticides in vegetable samples. *Food Chem*. 2022 Dec 1;396.
48. Chang CH, Subramani B, Yu CJ, Du JC, Chiou HC, Hou JW, et al. The association between organophosphate pesticide exposure and methylation of paraoxonase-1 in

- children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Environ Int* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Jul 16]; 171:107702. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412022006298>
49. Sapbamrer R, Hongsibsong S. Organophosphorus pesticide residues in vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao Lake of Northern Thailand. *Arch Environ Contam Toxicol* [Internet]. 2014 Mar 8 [cited 2025 Jul 16];67(1):60–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00244-014-0014-x>
50. Ganie SY, Javaid D, Hajam YA, Reshi MS. Mechanisms and treatment strategies of organophosphate pesticide induced neurotoxicity in humans: A critical appraisal. *Toxicology* [Internet]. 2022 Apr 30 [cited 2025 Jul 16]; 472:153181. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0300483X22000932>
51. Bravo N, Garí M, Grimalt JO. Occupational and residential exposures to organophosphate and pyrethroid pesticides in a rural setting. *Environ Res* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2025 Jul 16]; 214:114186. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0013935122015134>
52. Mali H, Shah C, Raghunandan BH, Prajapati AS, Patel DH, Trivedi U, et al. Organophosphate pesticides an emerging environmental contaminant: Pollution, toxicity, bioremediation progress, and remaining challenges. *J Environ Sci (China)*. 2023 May 1; 127:234–50.
53. Robb EL, Regina AC, Baker MB. Organophosphate Toxicity. *StatPearls* [Internet]. 2023 Nov 12 [cited 2025 Jul 20]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/>
54. PubChem. Chlorpyrifos [Internet]. [cited 2025 Jul 20]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorpyrifos#section=Physical-Description>
55. Hector Velásquez. Fuera Clorpirifos de la agricultura peruana [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 20]. Available from: <https://raaa.org.pe/blog/fuera-clorpirifos-de-la-agricultura-peruana>
56. Hernandez-Toledano DS, Salazar-Osorio AI, Medina-Buelvas DM, Romero-Martínez J, Estrada-Muñiz E, Vega L. Methylated and ethylated dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides: DNA damage in bone marrow cells of Balb/c mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2023 Jul 1;889.

57. Gavrilesco M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng Life Sci* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2025 Oct 14];5(6):497–526. Available from: [/doi/pdf/10.1002/elsc.200520098](https://doi.org/10.1002/elsc.200520098)
58. Arias-Estévez M, López-Periago E, Martínez-Carballo E, Simal-Gándara J, Mejuto JC, García-Río L. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric Ecosyst Environ* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2025 Oct 14];123(4):247–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880907001934>
59. Yadav R, Pandey V, Yadav SK, Khare P. Comparative evaluation of biodegradation of chlorpyrifos by various bacterial strains: Kinetics and pathway elucidation. *Pestic Biochem Physiol*. 2024 Aug 1;203.
60. Awasthi MD, Prakash NB. Persistence of chlorpyrifos in soils under different moisture regimes. *Pestic Sci*. 1997;50(1):1–4.
61. Raffa CM, Chiampo F. Bioremediation of Agricultural Soils Polluted with Pesticides: A Review. *Bioengineering* 2021, Vol 8, Page 92 [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2025 Oct 14];8(7):92. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/8/7/92/htm>
62. Putnam RA, Nelson JO, Clark JM. The persistence and degradation of chlorothalonil and chlorpyrifos in a cranberry bog. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2025 Jul 21];51(1):170–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12502403/>
63. ATSDR. Toxicological profile for Chlorpyrifos [Internet]. 1997 Sep [cited 2025 Jul 21]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>
64. Kollah B, Ahirwar U, Singh N, Dubey G, Patra A, Mohanty SR. Chlorpyrifos degradation under the influence of climate factors and fertilizer regimes in a tropical vertisol. *J Agric Sci* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 Jul 21];158(1–2):15–24. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-agricultural-science/article/abs/chlorpyrifos-degradation-under-the-influence-of-climate-factors-and-fertilizer-regimes-in-a-tropical-vertisol/63CD6E16ED56EA3F630AED45B8C2D429>
65. Chai LK, Wong MH, Hansen HCB. Degradation of chlorpyrifos in humid tropical soils. *J Environ Manage* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2025 Jul 21]; 125:28–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23632002/>
66. Singh BK, Walker A, Morgan JAW, Wright DJ. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ*

- Microbiol [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2025 Jul 21];69(9):5198–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12957902/>
67. Sanchez-Hernandez JC. Bioremediation of agricultural soils [Internet]. CRC Press, editor. 2019 [cited 2025 Sep 13]. 171 p. Available from: https://www.google.com.pe/books/edition/Bioremediation_of_Agricultural_Soils/JSiNDwAAQBAJ?hl=es&gbpv=0
68. Khatun P, Islam A, Sachi S, Islam MZ, Islam P. Pesticidas en la producción de hortalizas en Bangladesh: una revisión sistemática de los niveles de contaminación y los riesgos para la salud asociados en la última década. Toxicol Rep [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Oct 16]; 11:199–211. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85170520007?origin=resultslis>
69. Phan NT, Joshi NK, Rajotte EG, Zhu F, Peter KA, López-Uribe MM, et al. Los pesticidas sistémicos en un almacén de polen de abeja solitaria afectan el desarrollo larvario y aumentan la mortalidad de las pupas. Ciencia del Medio Ambiente Total [Internet]. 2024 Mar 10 [cited 2025 Oct 16];915. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85183466833?origin=resultslis>
70. Xiong Q, Xie Z, Yu B, Yang Z, Zhang H, Fang Y, et al. Bidirectional uptake and redistribution, bio-stimuli responsive xyloglucan-based nanodelivery system for enhanced translocation of non-systemic pesticide in soybean plants. Chemical Engineering Journal [Internet]. 2024 Nov 15 [cited 2025 Oct 15]; 500:156310. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S138589>
71. Li G, Xu W, Qu H, Tian D, Zhong H, Li H. Selective wetting and transport of systemic pesticides on bionic stomatal surface regulated by host–guest interaction. Chemical Engineering Journal [Internet]. 2024 May 15 [cited 2025 Oct 16]; 488:150878. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S1385894724023659?via%3Dihub>
72. Wu T, Zhao K, Liu S, Bao Z, Zhang C, Wu Y, et al. Promising nanocarriers endowing non-systemic pesticides with upward translocation ability and microbial community enrichment effects in soil. Chemical Engineering Journal [Internet]. 2023 Oct 15 [cited 2025 Oct 16];474. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85168818072?origin=resultslis>
73. Łozowicka B, Kaczyński P, Mojsak P, Rusiłowska J, Beknazarova Z, Ilyasova G, et al. Systemic and non-systemic pesticides in apples from Kazakhstan and their impact on human health. Journal of Food Composition and Analysis [Internet]. 2020 Jul 1 [cited

- 2025 Oct 16];90. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85084088141?origin=resultslist>
74. Omeroglu PY, Acoglu Celik B, Koc Alibasoglu E. The Effect of Household Food Processing on Pesticide Residues in Oranges (*Citrus sinensis*). *Foods*. 2022 Dec 1;11(23).
75. Riccio R, Trevisan M, Capri E. Effect of surface waxes on the persistence of chlorpyrifos-methyl in apples, strawberries and grapefruits. *Food Addit Contam [Internet]*. 2006 Jul [cited 2025 Jul 22];23(7):683–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16751145/>
76. Calliera M, Balderacchi M, Capri E, Trevisan M. Prediction of agrochemical residue data on fruit using an informatic system (PARDIS model). *Pest Manag Sci [Internet]*. 2008 Oct [cited 2025 Jul 22];64(10):981–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18498079/>
77. Guo Y, Wu C, Hu S yu, Xie Y xuan, Wu W yan, Li B xin, et al. ChpR-displaying bacteria for bioremediation of chlorpyrifos and TCP: A whole-cell biosorbent approach. *Water Res [Internet]*. 2025 Sep 1 [cited 2025 Oct 14]; 283:123775. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0043135425006840>
78. Ministerio de Salud. Resolución Ministerial N° 1006-2016-MINSA [Internet]. 2016 Dec [cited 2025 Jul 22]. Available from: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/192686/191407_RM-N1006-2016-MINSA.pdf20180904-20266-f9oqn5.pdf?v=1593817044
79. Plataforma del Estado Peruano. Resolución Ministerial N° 1006-2016-MINSA [Internet]. 2016 [cited 2025 Jul 22]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/191407-1006-2016-minsa>
80. Diario El Peruano. Resolución Directoral N° D000015-2024-MIDAGRI-SENASA [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 22]. Available from: <https://busquedas.elperuano.pe/dispositivo/NL/2271038-1>
81. Diario El Peruano. Resolución Directoral N° 0032-2023-MIDAGRI-SENASA [Internet]. Vol. 2023 Jul [cited 2025 Jul 22]. Available from: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4830062/RD%200032-2023-MIDAGRI-SENASA.pdf?v=1689166402>
82. Plataforma del Estado Peruano. Resolución Directoral N° 0032-2023-MIDAGRI-SENASA [Internet]. 2023 [cited 2025 Jul 22]. Available from:

- <https://www.gob.pe/institucion/senasa/normas-legales/4414986-0032-2023-midagri-senasa>
83. Agroperú. El 47 % de alimentos monitoreados superó los límites de pesticidas permitidos en Perú [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 22]. Available from: <https://www.agroperu.pe/el-47-de-alimentos-monitoreados-supero-los-limites-de-pesticidas-permitidos-en-peru/>
 84. Alejandro Delgado. Reportan altos niveles de pesticidas en piñas que se venden en Lima [Internet]. 2025 [cited 2025 Jul 23]. Available from: <https://www.infobae.com/peru/2025/01/23/reportan-altos-niveles-de-pesticidas-en-pinas-que-se-venden-en-lima-superan-limites-maximos-de-residuos/>
 85. SPDA. Detectan pesticidas prohibidos en frutas y verduras de conocidos supermercados de Lima [Internet]. 2025 [cited 2025 Jul 23]. Available from: <https://www.actualidadambiental.pe/detectan-pesticidas-prohibidos-en-frutas-y-verduras-de-conocidos-supermercados-de-lima/>
 86. García-Vara M, Postigo C, Palma P, López de Alda M. Development of QuEChERS-based multiresidue analytical methods to determine pesticides in corn, grapes and alfalfa. *Food Chem.* 2023 Mar 30;405.
 87. Samadifar M, Yamini Y, Khataei MM. Magnetically solid-phase extraction of diazinon and chlorpyrifos pesticides in vegetables using covalent triazine-based framework incorporated chitosan nanocomposite. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2023 May 1;118.
 88. Hrynko I, Kaczyński P, Łozowicka B. A global study of pesticides in bees: QuEChERS as a sample preparation methodology for their analysis – Critical review and perspective. *Science of the Total Environment.* 2021 Oct 20;792.
 89. Zhang Y, Tan L, Wang K, Wang N, Wang J. Highly Efficient Selective Extraction of Chlorpyrifos Residues from Apples by Magnetic Microporous Molecularly Imprinted Polymer Prepared by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Surface Polymerization. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2023 Jan 18 [cited 2025 Jul 23];71(2):1046–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36621942/>
 90. Chen X, Tian W. Selective extraction and determination of chlorpyrifos residues from aqueous samples using biochar-functionalized molecularly imprinted polymer combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2025 Jan 25 [cited 2025 Jul 23];1741. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39718260/>
 91. Harshit D, Charmy K, Nrupesh P. Organophosphorus pesticides determination by novel HPLC and spectrophotometric method. *Food Chem.* 2017 Sep 1; 230:448–53.

92. Gonzales Elvis, Reynoso Juan, Yucra Ricardo, Choquenaira Celia. Development of a rapid method for the quantification of methamidophos and chlorpyrifos by Thin Layer Chromatography in soils using image processing. Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology [Internet]. 2022 Jul [cited 2025 Jul 23]; Available from: https://laccei.org/LACCEI2022-BocaRaton/full_papers/FP781.pdf
93. Dominguez A. Determinación de pesticidas en limón por espectroscopía Raman intensificada en superficie (SERS) [Internet]. 2024 [cited 2025 Jul 23]. Available from: <https://ridunt.unt.edu.ar/handle/123456789/1553>
94. Dominguez AN, Agudo GE, Álvarez RMS. Detección de pesticidas en aceite esencial de limón empleando las técnicas SERS y TLC acopladas. Libro de Resúmenes XXIII CAFQI [Internet]. 2023 Apr 5 [cited 2025 Jul 23]; Available from: <https://conferencias.unpa.edu.ar/index.php/cafqi/article/view/217>
95. Shen Z, Xu D, Wang G, Geng L, Xu R, Wang G, et al. Novel colorimetric aptasensor based on MOF-derived materials and its applications for organophosphorus pesticides determination. J Hazard Mater [Internet]. 2022 Oct 15 [cited 2025 Jul 23]; 440:129707. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030438942201500X#bib15>
96. Birajdar A. Principios básicos de cromatografía y HPLC. PHARMA MED PRESS; 2023.
97. Kazakevich Y V., LoBrutto R, Votano J, Parham M, Hall L. HPLC for Pharmaceutical Scientists (Google eBook). 2007 [cited 2025 Jul 24];644–5. Available from: https://books.google.com/books/about/HPLC_for_Pharmaceutical_Scientists.html?hl=es&id=NOLUfSPiGIYC
98. Serban Victor. Essentials in Modern HPLC Separations - Google Books [Internet]. Elsevier, editor. 2022 [cited 2025 Jul 24]. 18–96 p. Available from: https://www.google.com.pe/books/edition/Essentials_in_Modern_HPLC_Separations/44NTEAAAQBAJ?hl=es&gbpv=0
99. David Hage. Cromatografía de adsorción: una visión general [Internet]. 2018 [cited 2025 Jul 25]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/adsorption-chromatography>
100. Elena Dreassi, Giuseppe Ceramelli, Pietro Corti. Practical thin-layer chromatography: A multidisciplinary approach. Sherma Joseph, Fried B, editors. In Practical Thin-Layer

- Chromatography [Internet]. 1996 [cited 2025 Jul 24];209–47. Available from: https://books.google.com/books/about/Practical_Thin_Layer_Chromatography.html?hl=es&id=G1DqqdmHR9cC
101. Hitachi. Modo de separación y columna: Hitachi High-Tech Corporation [Internet]. [cited 2025 Jul 24]. Available from: <https://www.hitachi-hightech.com/global/en/knowledge/analytical-systems/hplc/hplc-basics/course4.html#sec-2>
 102. Berezkin VG. Gas chromatography | Gas-solid chromatography. Encyclopedia of Analytical Science. 2019 Jan 1;180–5.
 103. Finetech. Filtro Florisil SPE [Internet]. [cited 2025 Jul 25]. Available from: <https://www.finetech-filters.com/florisil-spe>
 104. Biocomma. Copure® Florisil Grado Pesticida Florisil [Internet]. [cited 2025 Aug 1]. Available from: <https://www.biocomma.com/products/chromatography-and-mass-spectrometry/spe-cartridges/137.html>
 105. Mohamed Nour. Determinación de PAHs en muestras ambientales mediante fluorimetría y HPLC. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 1994.
 106. Volonté María. Cromatografía Líquida de Alta Resolución [Internet]. [cited 2025 Aug 3]. p. 81–5. Available from: https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/150656/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 107. Bozan B, Baser KHC, Kara S. Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC-densitometry. *Fitoterapia* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2025 Aug 3];70(4):402–6. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0367326X99000660>
 108. Karuna R, Sashidhar RB. Use of ion-exchange chromatography coupled with TLC-laser scanning densitometry for the quantitation of fumonisin B1. *Talanta* [Internet]. 1999 Sep 13 [cited 2025 Aug 3];50(2):381–9. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0039914099001319>
 109. Jaxel J, Rodriguez J, Rerat A, Rosenau T, Hansmann C, Liebner F, et al. Robust and fast absolute quantification of a colored wood surface coating by scanning densitometry. *Appl Surf Sci*. 2020 Mar 1;505.
 110. Bodoki E, Oprean R, Vlase L, Tamas M, Sandulescu R. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. *J Pharm Biomed Anal*. 2005 Apr 29;37(5):971–7.

111. Hemdan A, Ahmed N, Galal MM, Zaazaa HE. TLC vs. HPLC: A green comparison for veterinary drug analysis. *Microchemical Journal* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Aug 3]; 207:112149. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0026265X24022616>
112. Cabezudo I, L. E. Furlan R. Thin layer chromatography assay to detect laccase inhibitors. *Food Chem.* 2024 Dec 1;460.
113. Farid NF, Elgendy MO, Abdelwahab NS. Sustainable TLC-densitometric method for pharmacokinetic study of the concurrently used ibuprofen and metronidazole: Green metric assessment. *Microchemical Journal.* 2022 Aug 1;179.
114. Kokotkiewicz A, Migas P, Stefanowicz J, Luczkiewicz M, Krauze-Baranowska M. Densitometric TLC analysis for the control of tropane and steroidal alkaloids in *Lycium barbarum*. *Food Chem.* 2017 Apr 15; 221:535–40.
115. Costantini A, Paoli F. Melatonin: quantitative analysis in pharmaceutical oral dosage forms using thin-layer chromatography (TLC) densitometry. *Il Farmaco* [Internet]. 1998 Jun 30 [cited 2025 Aug 3];53(6):443–7. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/abs/pii/S0014827X98000408>
116. Wall Peter. *Thin-layer Chromatography A Modern Practical Approach.* 2005. p. 155–61.
117. Tocher. *Thin-layer Chromatography.* *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2025 Aug 3];1267–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B012227055X002315>
118. Colin Poole. *Instrumental Thin-Layer Chromatography - Google Libros* [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 3]. p. 190–389. Available from: https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=knp5EAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=V3JzcUsgln&sig=YZC3RYSh1R4GvrB45mVJsjk52oU&redir_esc=y#v=snippet&q=precision&f=false
119. Santos JM, Balieiro LM, Santos RS, Matsuda MMN, Araújo EB. Validation of chromatographic methods, TLC and HPLC, to quantify known radiochemical impurities and the radiochemical purity the radiopharmaceutical [¹⁷⁷Lu] Lu-PSMA I&T. *Applied Radiation and Isotopes.* 2025 Jan 1;215.
120. Reich E, Blatter A. *Thin Layer Chromatography: Instrumentation.* *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2025 Aug 4];91–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012369397700621X>

121. Merck. TLC Process [Internet]. [cited 2025 Aug 4]. Available from: <https://www.merckmillipore.com/PE/es/analytics-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/tlc-process/dqyb.qB.rqoAAAFVRIBDx07I,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>
122. Riley Christopher, Rosanske Thomas. Development and Validation of Analytical Methods - Google Libros [Internet]. Elsevier, editor. 1996 [cited 2025 Aug 4]. 12 p. Available from: <https://books.google.to/books?id=9UDI0UjWGp0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
123. Gójska AM. Validation of analytical methods and detection limits in spectroscopic measurements of Ag–Cu alloys. *Radiation Physics and Chemistry*. 2025 Apr 1;229.
124. Chavhan ML, Shirkhedkar AA, Surana SJ. Development and validation of a stability indicating RP-TLC/densitometric method for determination of Loratadine in bulk and in tablets. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017 Feb 1; 10: S825–30.
125. Sadek Paul. High-performance liquid chromatography solvent guide. 2002;67–71.
126. AOAC International. Guidelines for Standard Method Performance Requirements [Internet]. 2016 [cited 2025 Jul 10]. p. 9. Available from: https://www.aocac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf
127. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals [Internet]. 2013 [cited 2025 Oct 23]. p. 24. Available from: https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/d-AOAC_Guidelines_For_Single_Laboratory_Validation_Dietary_Supplements_and_Botanicals.pdf
128. Correa A, Pereira E, Schneider K, Gomes B, Tavares A, Budziak D, et al. Color, volatile organic and phenolic compounds in garlic after curing in a shaded environment at ambient conditions. *Postharvest Biol Technol*. 2025 Apr 1;222.
129. Ministerio de Agricultura. Situación actual de la producción de ajo en el Perú [Internet]. 2008 [cited 2025 Aug 4]. Available from: <https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/ajo.pdf>
130. Pérez Moreno L, García Rincón PM, Ramírez Malagón R, Barrera Guerra JL. Evaluación de Cultivares de Ajo Morado y Blanco por su Rendimiento Agronómico e Industrial en Irapuato, Guanajuato. *Acta Univ* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2025 Aug 4];13(3):57–65. Available from: https://www.researchgate.net/publication/238755278_Evaluacion_de_Cultivares_de_Ajo_Morado_y_Blanco_por_su_Rendimiento_Agronomico_e_Industrial_en_Irapuato_Guanajuato

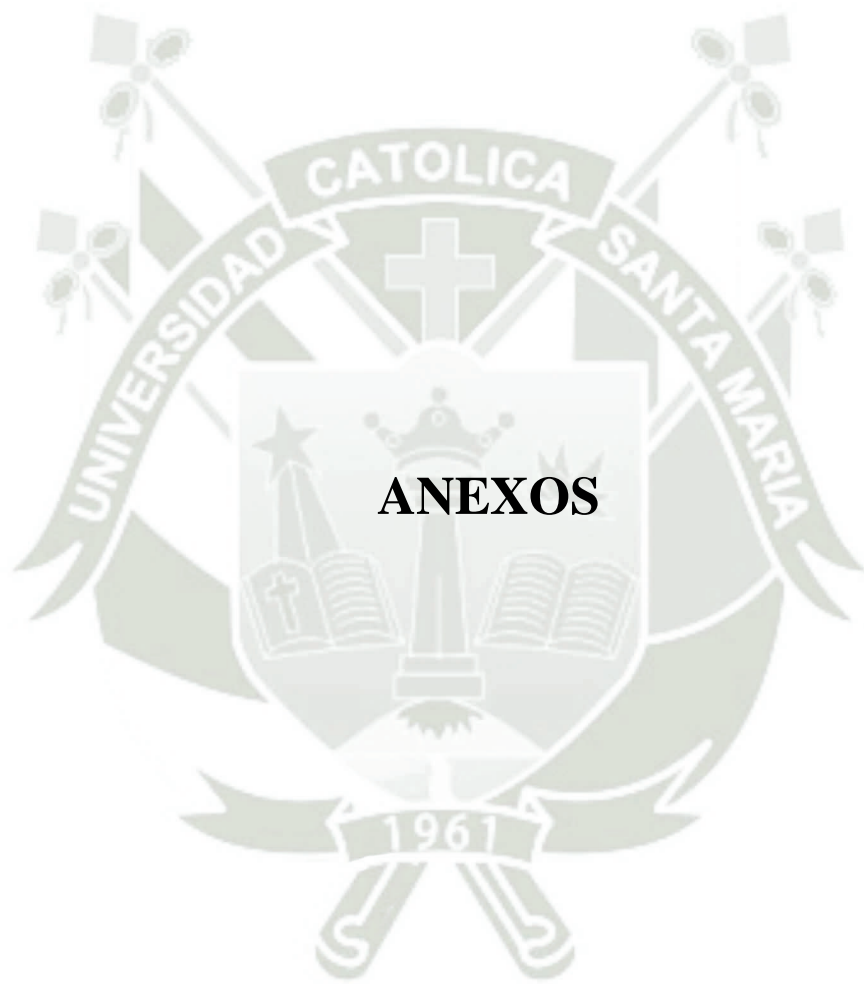
131. Sin Reservas. Oda al ajo: 10 formas de prepararlo y consumirlo [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 4]. Available from: <https://sinreservas.com.ar/contenido/390/oda-al-ajo-10-formas-de-prepararlo-y-consumirlo>
132. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *J Nutr* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2025 Aug 4];131(3):955S-962S. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316622147772>
133. Bataduwaarachchi VR, Liyanage DCJ, Hansanie SMN, Perera HDSM, D’Cruz LG. Therapeutic potential of Garlic (*Allium sativum* L.) on new models of asthma immune pathobiology: A review. *Phytomedicine Plus* [Internet]. 2025 Feb 1 [cited 2025 Oct 26];5(1):100749. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2667031325000223>
134. Jikah AN, Edo GI. Mechanisms of action by sulphur compounds in *Allium sativum*. A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Oct 26]; 9:100323. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2667142523001094>
135. Córdor José. Validación de un cultivar de ajo de buen rendimiento y calidad de bulbo tolerante al cambio climático para condiciones agroecológicas de costa y sierra [Internet]. [cited 2025 Aug 4]. Available from: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1251232/Resultados_PNIA_137_PL.pdf?v=1597941062
136. FreshPlaza. Las exportaciones de ajo de Perú se recuperaron en diciembre [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 4]. Available from: <https://www.freshplaza.es/article/9692591/las-exportaciones-de-ajo-de-peru-se-recuperaron-en-diciembre/>
137. Agroperú. Ajo peruano: Exportaciones disminuyen en volumen, pero aumentan en valor [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 5]. Available from: <https://www.agroperu.pe/ajo-peruano-exportaciones-disminuyen-en-volumen-pero-aumentan-en-valor/>
138. Romero César. Mercado del ajo [Internet]. Lima; 2020 [cited 2025 Aug 5]. Available from: <https://repositorio.midagri.gob.pe/bitstream/20.500.13036/740/1/Mercado%20del%20ajo%20y%20las%20exportaciones%20peruanas.pdf>
139. MIDAGRI. MIDAGRI libera semilla mejorada de ajo: INIA 105 – Donajus, para elevar rentabilidad de productores [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 5]. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/1121611-midagri-libera-semilla-mejorada-de-ajo-inia-105-donajus-para-elevar-rentabilidad-de-productores>

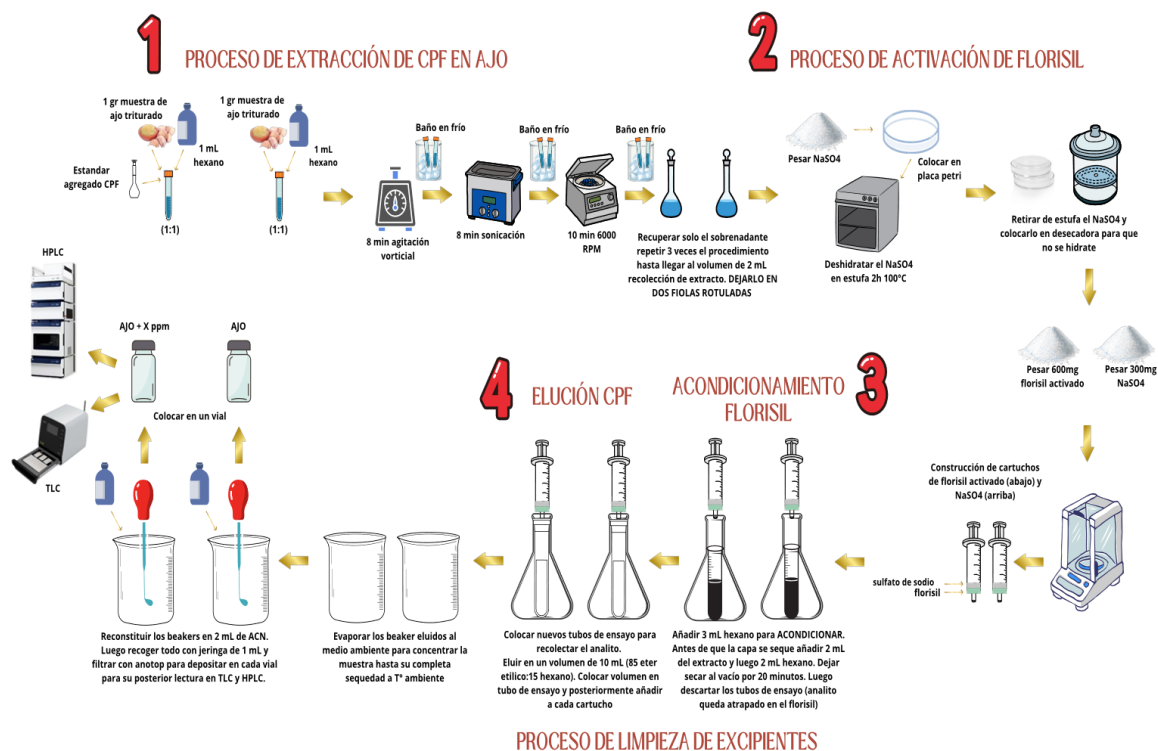
140. Wondimu KT, Geletu AK, Kedir WM. Recent developments in monitoring of organophosphorus pesticides in food samples. *J Agric Food Res* [Internet]. 2025 Mar 1 [cited 2025 Jul 31]; 19:101709. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666154325000808#bib62>
141. Pandey S, Malviya M, Chandravanshi LP. Optimization of VA-DLLME methodology for the determination of beta-cyfluthrin in blood and urine sample of human by TLC-image analysis: Validated by AGREE and complex GAPI tools. *Green Analytical Chemistry*. 2025 Mar 1;12.
142. Li G, Wen A, Liu J, Wu D, Wu Y. Facile extraction and determination of organophosphorus pesticides in vegetables via magnetic functionalized covalent organic framework nanocomposites. *Food Chem*. 2021 Feb 1;337.
143. Mandal S, Poi R, Hazra DK, Ansary I, Bhattacharyya S, Karmakar R. Review of extraction and detection techniques for the analysis of pesticide residues in fruits to evaluate food safety and make legislative decisions: Challenges and anticipations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2023 Jan 15;1215.
144. Sinha SN, Vasudev K, Vishnu Vardhana Rao M. Quantification of organophosphate insecticides and herbicides in vegetable samples using the “quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe” (QuEChERS) method and a high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry (LC-MS/MS) technique. *Food Chem*. 2012 Jun 1;132(3):1574–84.
145. EPA. EPI Suite™ [Internet]. [cited 2025 Oct 15]. Available from: <https://episuite.dev/EpiWebSuite/#/results;cas=002921-88-2>
146. PubChem. Hexane [Internet]. [cited 2025 Aug 6]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n-HEXANE#section=Solubility>
147. Dogheim Salwa. Chlorpyrifos [Internet]. Cairo; [cited 2025 Aug 6]. Available from: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation04/CHLORPYRIFOS.pdf
148. EPA. Method 3620C: Florisil CleanUp [Internet]. 2014 Jul [cited 2025 Jul 31]. Available from: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3620c.pdf>
149. Mateus EG, Vargas NO, Rodriguez JPG. Determination of multiclass pesticides in river sediments via matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2022 Aug 1;43(15):1577–86.

150. Song L, Pan C, Yang J, Zeng S, Han Y. Dual-layer column filtration cleanup and gas chromatography-tandem mass spectrometry detection for the analysis of 39 pesticide residues in porcine meat. *J Sep Sci*. 2020 Apr 1;43(7):1306–15.
151. Sorbtech. Florisil [Internet]. [cited 2025 Aug 6]. Available from: <https://www.sorbtech.com/chromatography/adsorbents/florisil/>
152. Shang X, Gao L, Sun Z, Liang Z, Liu X, Lin C, et al. Insights into different microwave-activated persulfate systems for chlorpyrifos degradation in soil: Impacts of soil properties, toxicity, and energy consumption. *Soil & Environmental Health* [Internet]. 2025 Apr 1 [cited 2025 Oct 26];3(2):100139. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2949919425000123>
153. Hrynko I, Kaczyński P, Pietruszyńska M, Łozowicka B. The effect of food thermal processes on the residue concentration of systemic and non-systemic pesticides in apples. *Food Control* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Oct 26]; 143:109267. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0956713522004601>
154. Khan M., Rahman M., Malek M., Azad A., Chowdhury M. Evaluation of TLC (Thin Layer Chromatography) Methods for Pesticide Residue Analysis [Internet]. 2010 [cited 2025 Nov 3]. p. 92. Available from: https://www.researchgate.net/publication/236174422_Evaluation_of_TLC_Thin_Layer_Chromatography_Methods_for_Pesticide_Residue_Analysis
155. Keikavousi Behbahan A, Mahdavi V, Roustaei Z, Bagheri H. Preparation and evaluation of various banana-based biochars together with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of diverse pesticides in fruiting vegetables. *Food Chem* [Internet]. 2021 Oct 30 [cited 2025 Oct 22]; 360:130085. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S0308814621010918>
156. Wang Y, Abd El-Aty AM, Wang S, Cui X, Zhao J, Lei X, et al. Competitive fluorescent immunosensor based on catalytic hairpin self-assembly for multiresidue detection of organophosphate pesticides in agricultural products. *Food Chem* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Oct 22];413. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85147605979?origin=resultslist>
157. Nessiem MA, Riad SM, Fayed AS, Arafa RM. Comparative study for chiral separation of Atracurium besylate isomers: Eco-friendly HPLC using Lux Cellulose-3 chiral column, and TLC-Densitometry approaches. *Sustain Chem Pharm* [Internet]. 2024 Feb

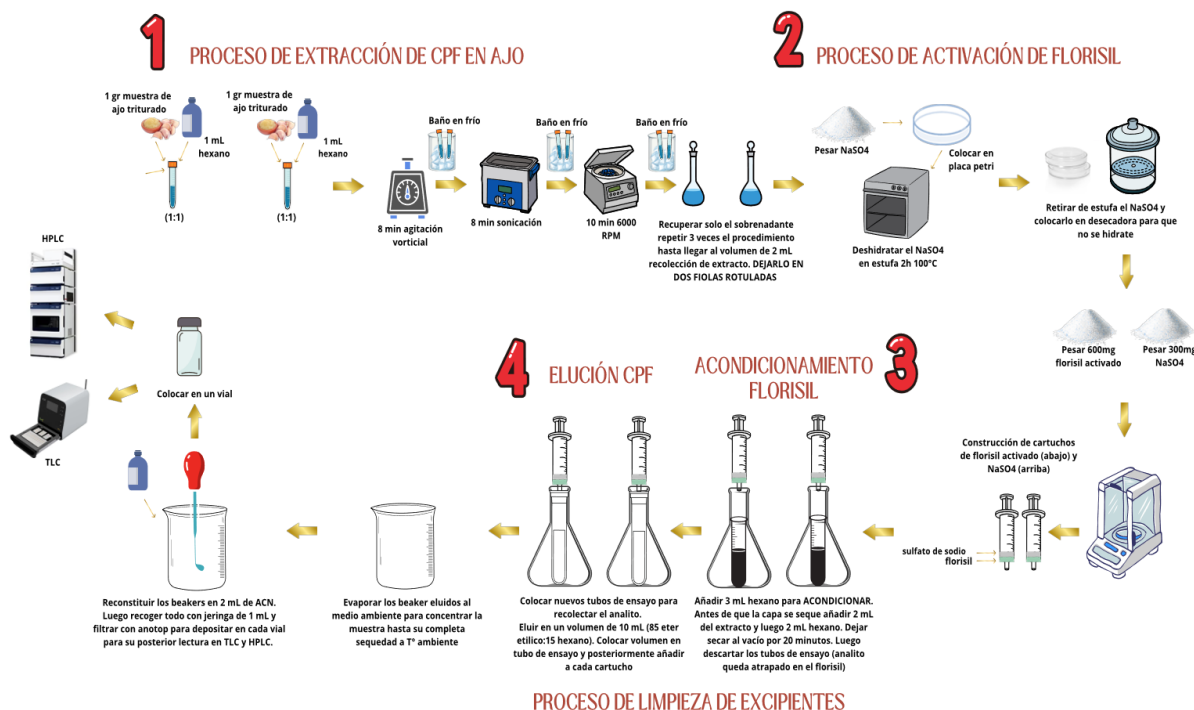
- 1 [cited 2025 Oct 22];37. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85179070687?origin=resultslist>
158. Adamczuk N, Migas P, Kimel K, Choma IM, Krauze-Baranowska M. TLC con análisis densitométrico y de imágenes en el control del contenido de antocianinas en frutos de cultivares e híbridos de *Rubus occidentalis* y *Rubus idaeus*. *Revista de composición y análisis de alimentos* [Internet]. 2025 Jan 1 [cited 2025 Oct 22];137. Available from: <https://www-scopuscom.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85206976782?origin=resultslist>
159. Geiss Friedrich. *Fundamentals of thin layer chromatography: planar chromatography*. A. Hüthig; 1987. 482 p.
160. Ramírez-Jiménez R, Oregel-Zamudio E. Preliminary study for the determination of pesticides in vegetables marketed in a zone of Michoacán (México). *Revista de Ciencias Ambientales*; Vol 52 Núm 2 (2018): Julio-Diciembre [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2025 Oct 22];52(2):16. Available from: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/6718259>
161. Sherma J. Recent Advances in the Thin-Layer Chromatography of Pesticides: A Review. *J AOAC Int* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2025 Nov 3];86(3):602–11. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jaoac/86.3.602>
162. Mauldin RE, Primus TM, Buettgenbach TA, Johnston JJ, Linz GM. A Simple HPLC Method for the Determination of Chlorpyrifos in Black Oil Sunflower Seeds. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2025 Oct 22];29(3):339–48. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826070500451863>
163. Zalat OA, Elsayed MA, Fayed MS, Abd El Megid MK. Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative determination of chlorpyrifos. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* [Internet]. 2014 [cited 2025 Oct 22]; Vol. 2:58–63. Available from: www.ilcpa.pl
164. Gonzales Condori E. A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for the determination of chlorpyrifos and profenofos in soils by High Performance Liquid Chromatography. 2021;(1).
165. Quenguan F, Eraso E. Determinación de plaguicidas organofosforados y carbamatos en agua para consumo humano del departamento de Nariño mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-VWD) [Internet]. Universidad de Nariño; 2015 [cited 2025 Oct 22]. Available from: <https://sired.udenar.edu.co/780/1/90897.pdf>

166. Bahgat EA, Hashem H, Saleh H, Kamel EB, Eissa MS. Stability-indicating HPLC-DAD and TLC-densitometry methods for the quantification of bupivacaine and meloxicam in their co-formulated mixture. *Microchemical Journal* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Oct 22];190. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/85151622185?origin=resultlist>
167. Ahmed AB, Abdelwahab NS, Abdelrahman MM, Salama FM. Simultaneous determination of Dimenhydrinate, Cinnarizine and Cinnarizine impurity by TLC and HPLC chromatographic methods. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2025 Oct 22];55(1):163–9. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S1110093117300042>
168. Minh DTC, Thi LA, Thuy TTT, Anh NTK, Ha PTT, Hanh TT, et al. Green HPLC–DAD method for the analysis of analgesic and antihistamine drugs adulterated in herbal mixtures. *Green Analytical Chemistry* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2025 Oct 22];9:100116. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/science/article/pii/S2772577424000259>
169. El Walily A, El Gindy A, Bedair MF. Aplicación de la espectrofotometría UV de primera derivada, la densitometría por TLC y la cromatografía líquida para la determinación simultánea de clorhidrato de mebeverina y sulpirida. *Revista de análisis farmacéutico y biomédico* [Internet]. 1999 Nov 2 [cited 2025 Oct 22];21(3):535–48. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/0032759122?origin=resultlist>
170. Purnama I, Malhat F, Mutamima A, Nelvia N, Amalia A. Residuos múltiples de plaguicidas en arroz y persistencia de clorpirifos en suelos de turba. *Sustainable Chemistry One World* [Internet]. 2025 Sep 1 [cited 2025 Oct 22];7. Available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.ucsm.edu.pe/pages/publications/105009469963?origin=resultlist>

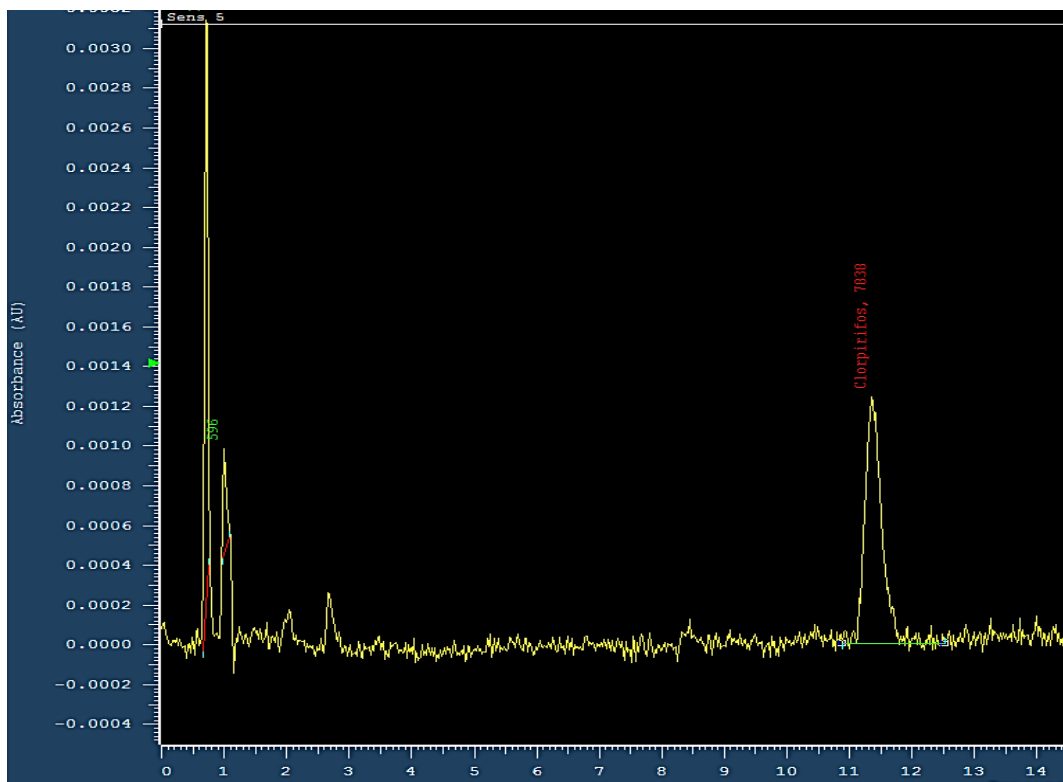




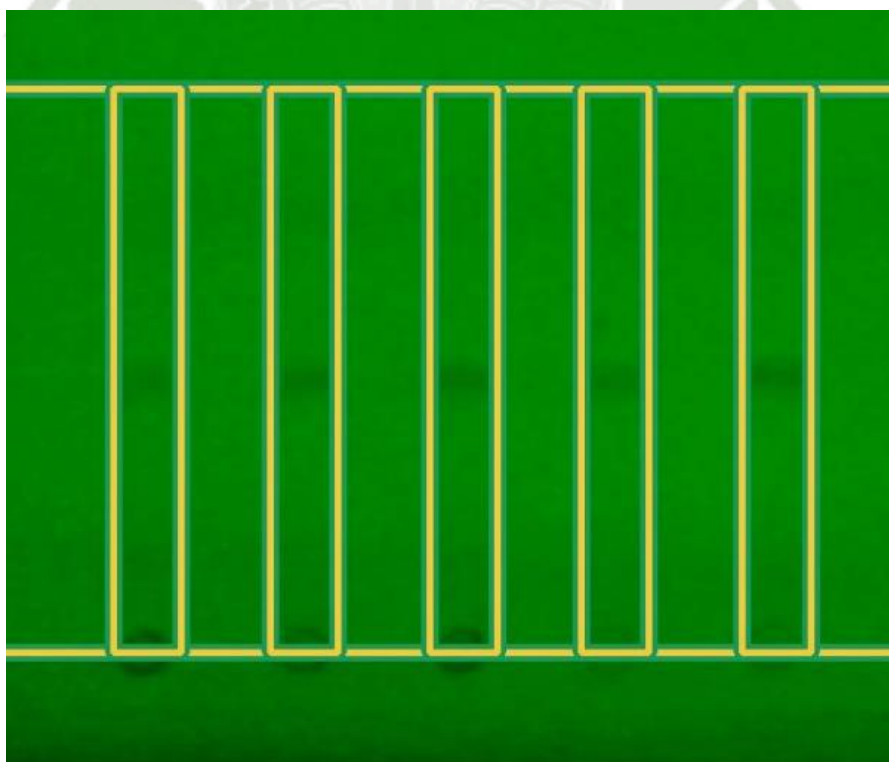
Anexo 1. Esquema del proceso de extracción del estándar clorpirifos en matriz de ajo para la validación del parámetro de exactitud en ambas metodologías.



Anexo 2. Esquema del proceso de extracción de clorpirifos en bulbos de ajo.



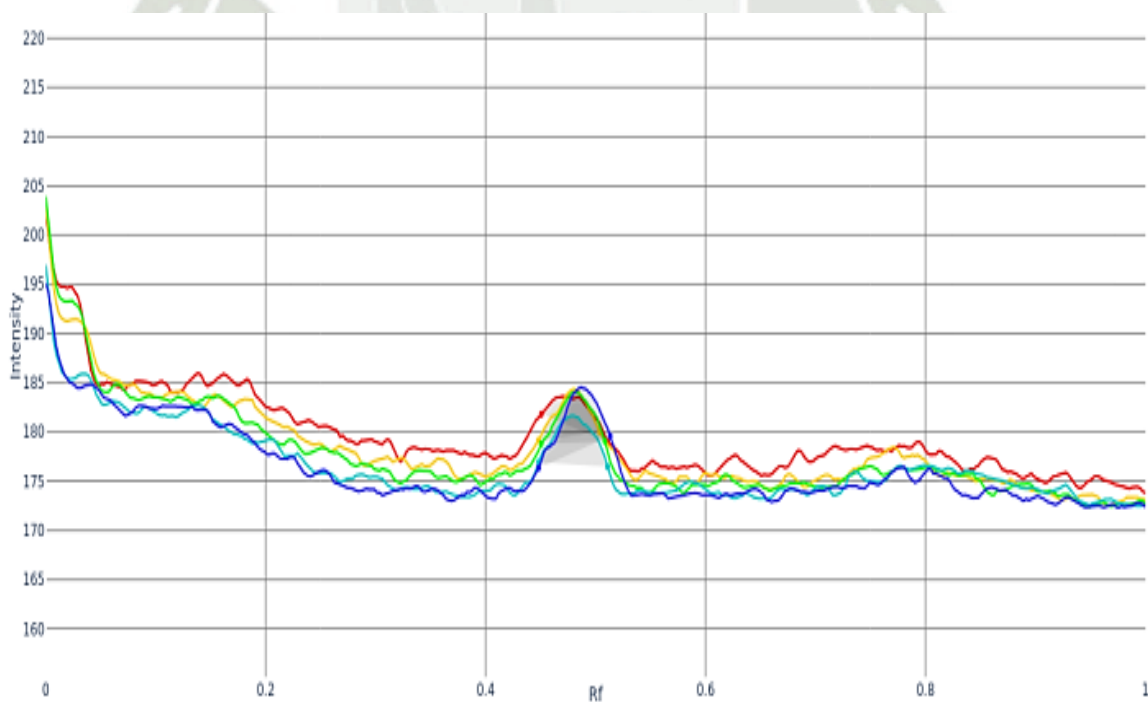
Anexo 3. Cromatograma estándar clorpirifos por el método de HPLC ($t_R=11.4$ min).



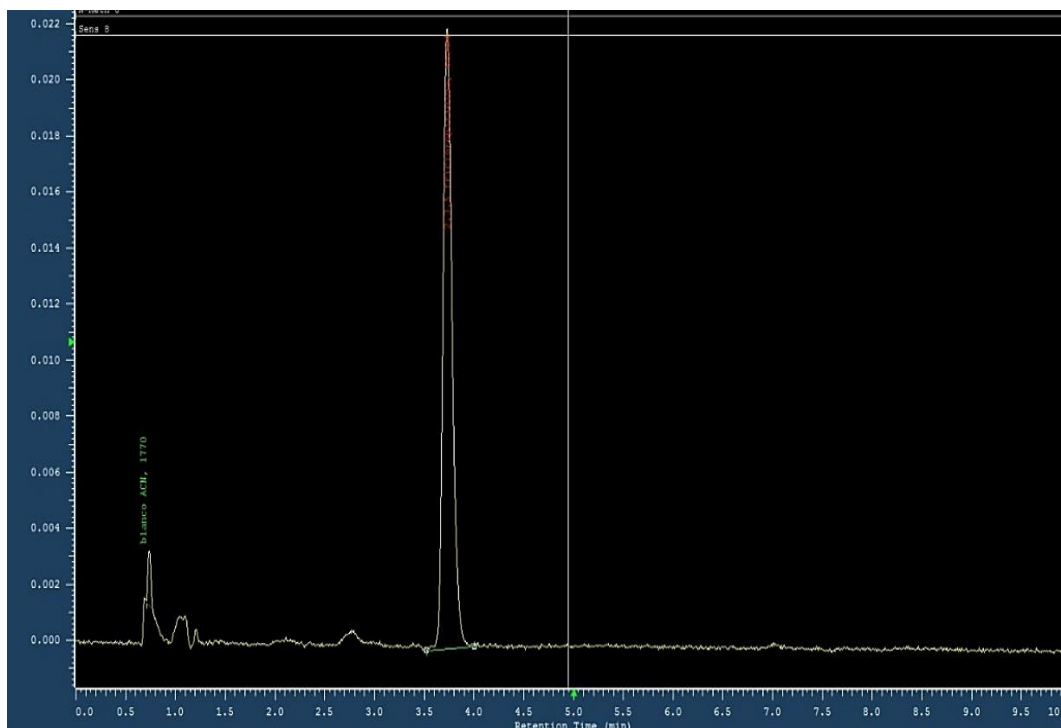
Anexo 4. Visualización UV (254 nm) curva de calibración clorpirifos ($R_f= 0.51$).



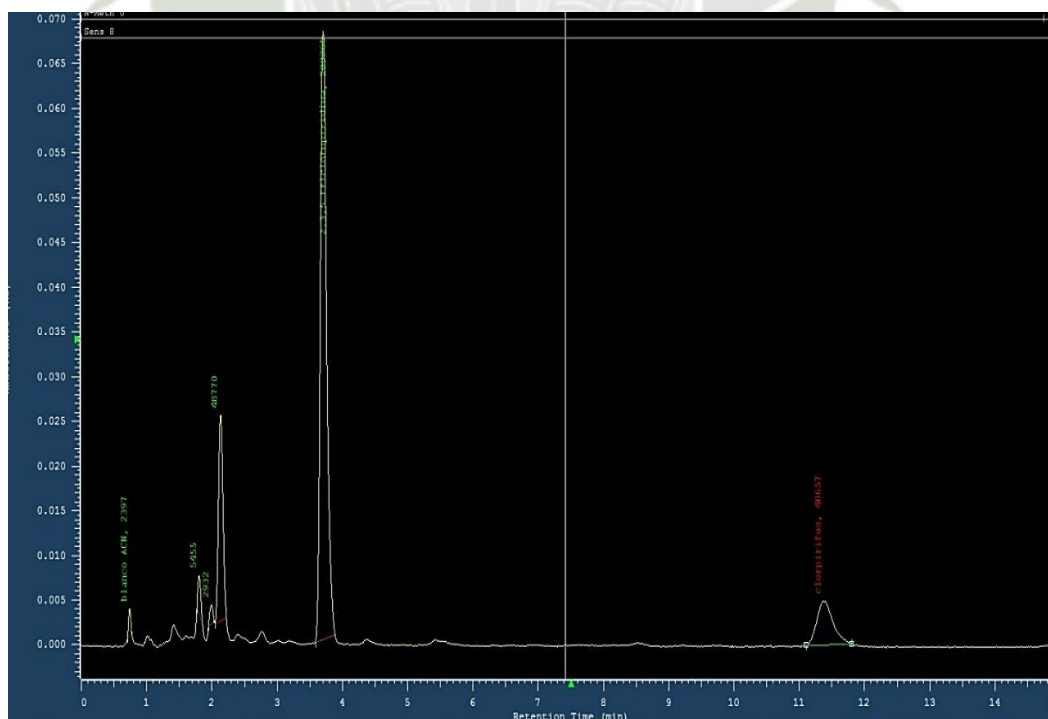
Anexo 5. Derivatización en TLC curva de calibración de clorpirifos, inmersión en reactivo $AgNO_3$ 0.12 M (140°C).



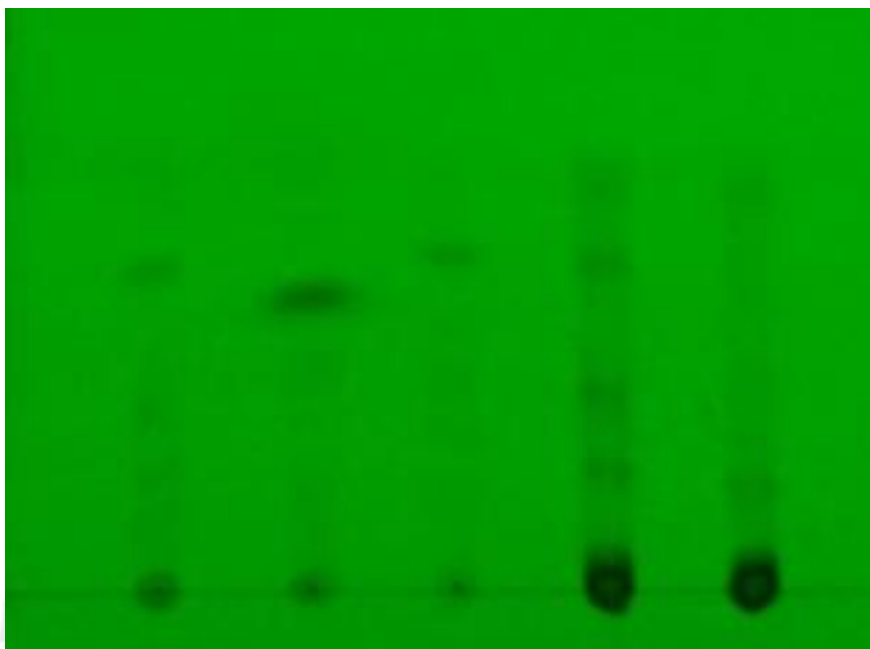
Anexo 6. Densitograma de la curva de calibración de clorpirifos por el método de densitometría con TLC ($R_f = 0.51$).



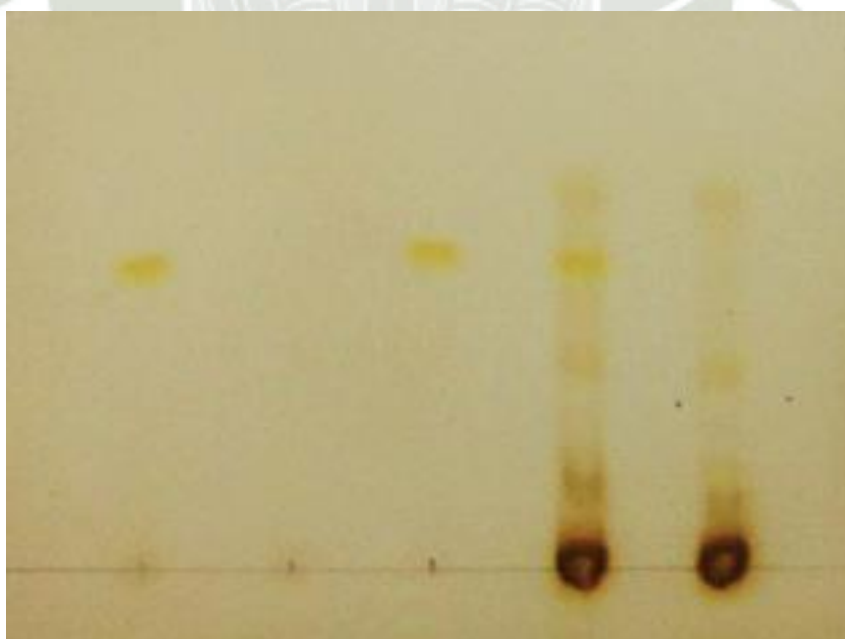
Anexo 7. Evaluación del tiempo de retención del compuesto 2,3,5-tricloropiridina en HPLC ($t_R=3.8$ min).



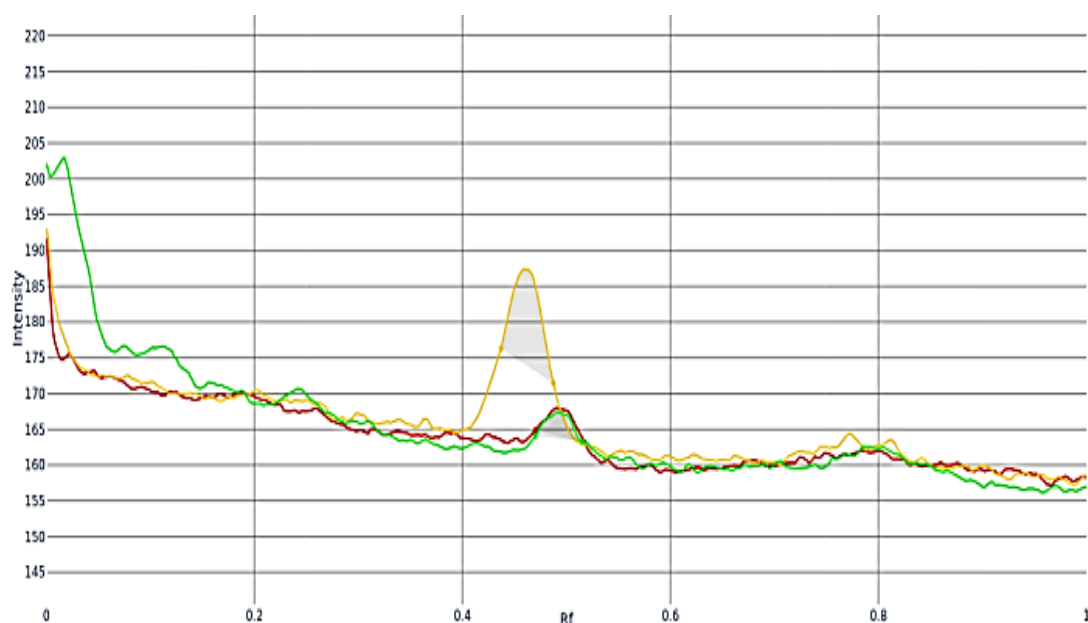
Anexo 8. Cromatograma evaluación de selectividad en HPLC de clorpirifos ($t_R=11.4$ min) y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina ($t_R=3.8$ min) en matriz de ajo.



Anexo 9. Visualización UV (254 nm) evaluación de selectividad del clorpirifos y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina por el método de densitometría con TLC.



Anexo 10. Visualización UV (254 nm) evaluación de selectividad del clorpirifos y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina por el método de densitometría con TLC.



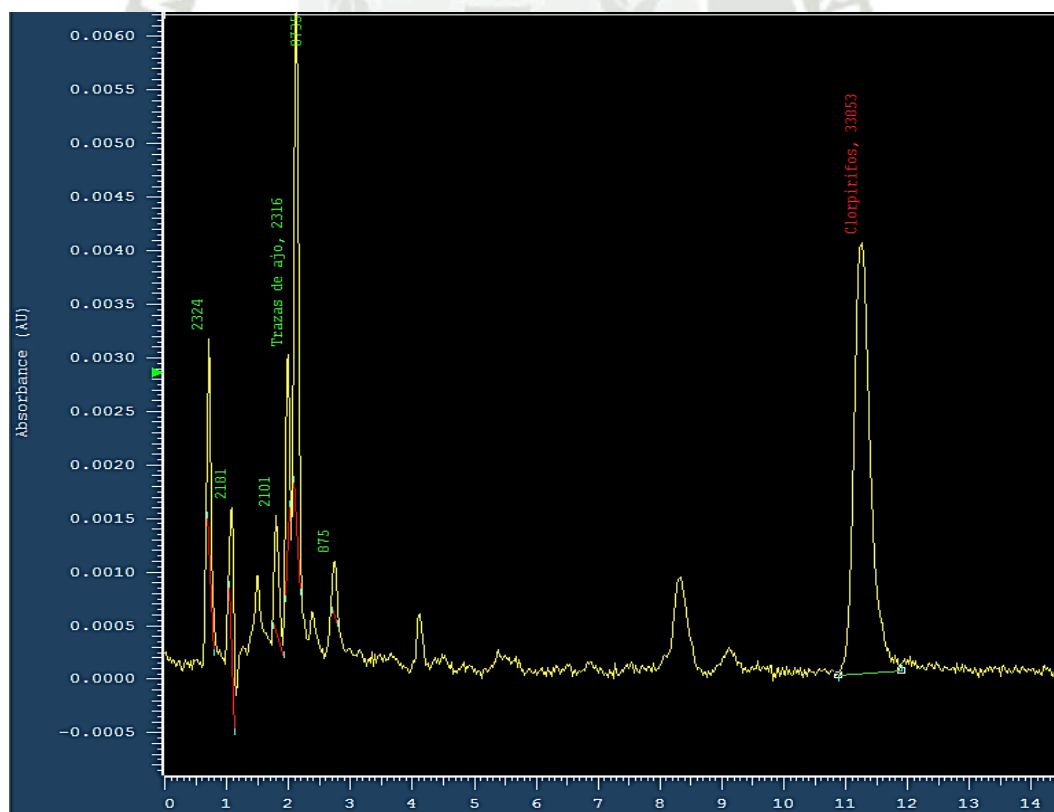
Anexo 11. Densitograma del estándar clorpirifos (pico verde, $R_f = 0.51$) y su compuesto de degradación 2,3,5-tricloropiridina (pico amarillo, ($R_f = 0.48$)).



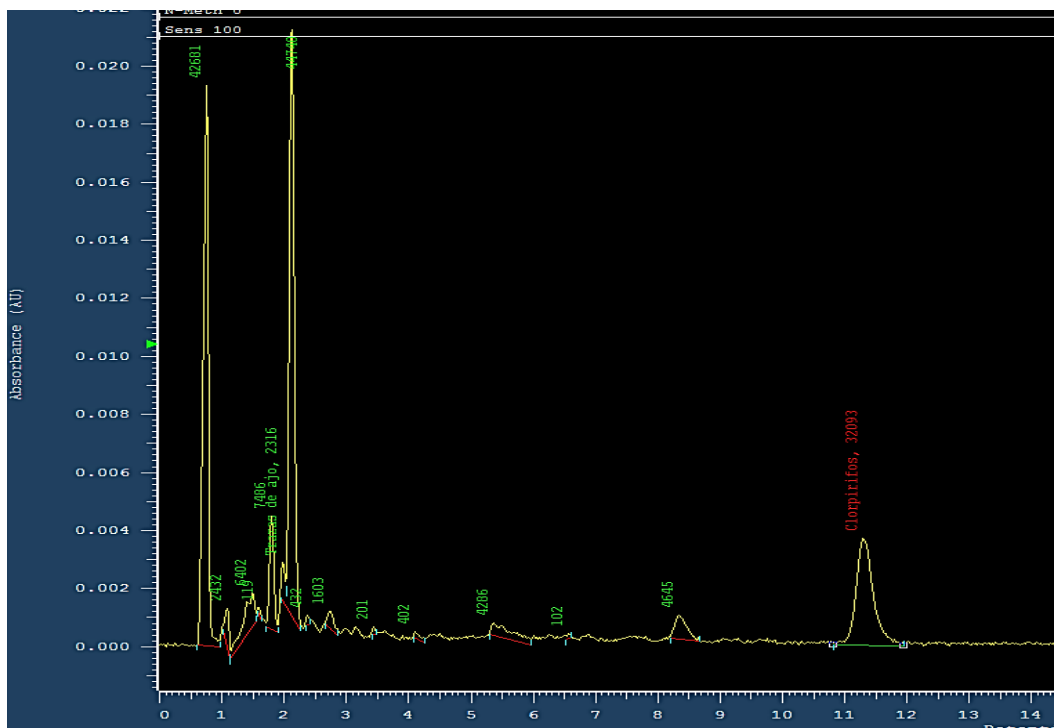
Anexo 12. Extracción del estándar clorpirifos en cartucho florisil con sulfato de sodio anhidro.



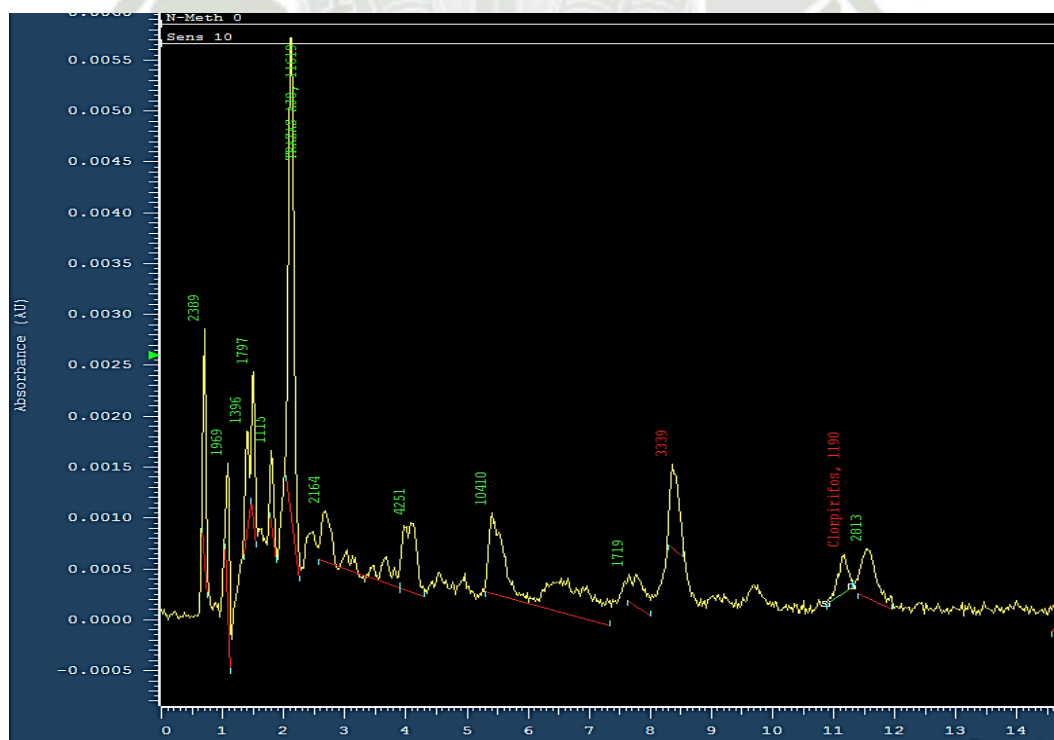
Anexo 13. Extractos recuperados por el método de extracción y clean up para la validación del método de exactitud.



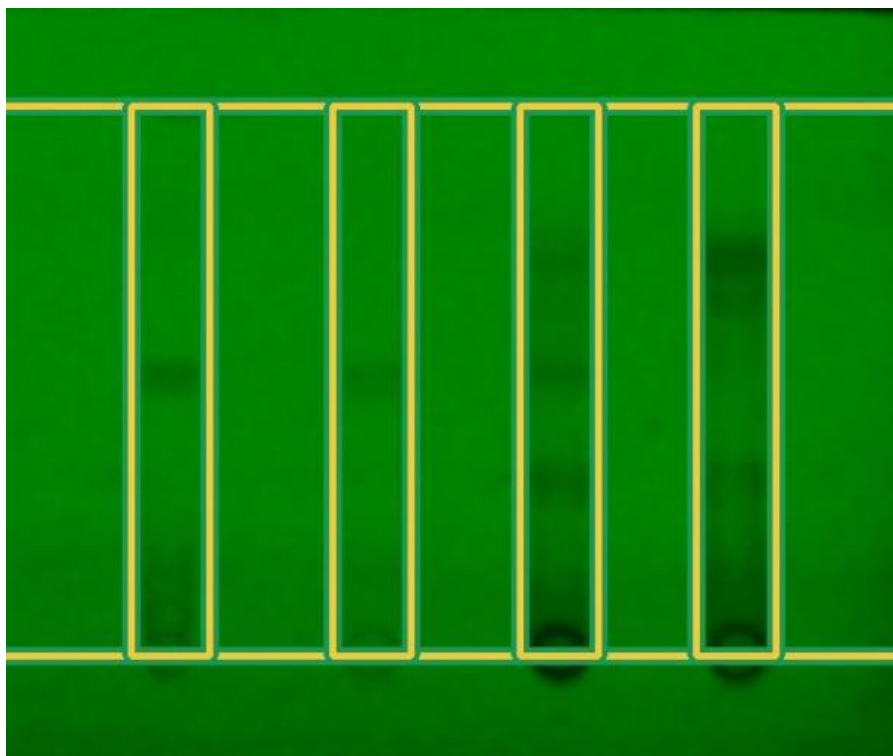
Anexo 14. Cromatograma del estándar clorpirifos 4 mg L⁻¹ recuperado por el método de extracción y clean up ($t_R=11.4$ min, área=33853).



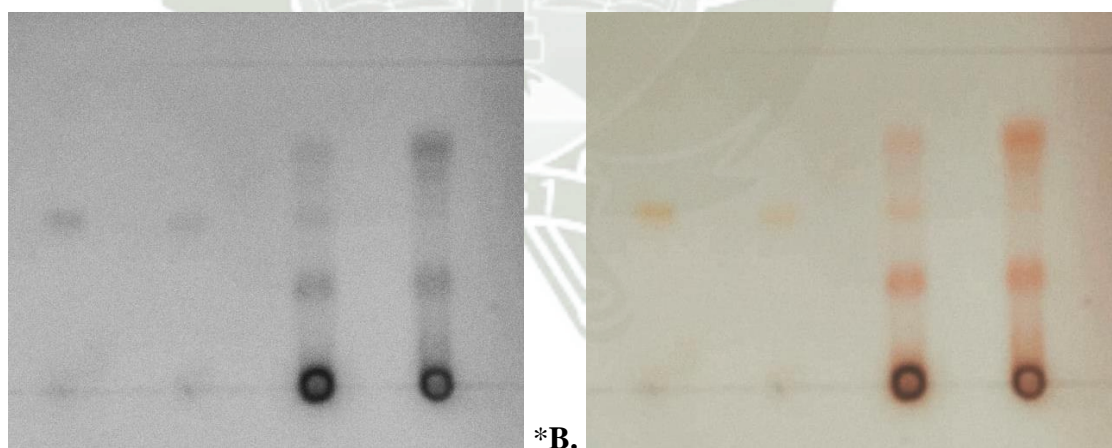
Anexo 15. Cromatograma de la muestra de ajo fortificada con estándar clorpirifos 4 mg L⁻¹ recuperada por el método de extracción y clean up ($t_R=11.4$ min, área=32093).



Anexo 16. Cromatograma de la muestra de ajo no fortificada recuperada por el método de extracción y clean up ($t_R=11.4$ min, área=1190).



Anexo 17. Visualización UV (254 nm) evaluación exactitud por el método de densitometría con TLC (40 mg L¹).



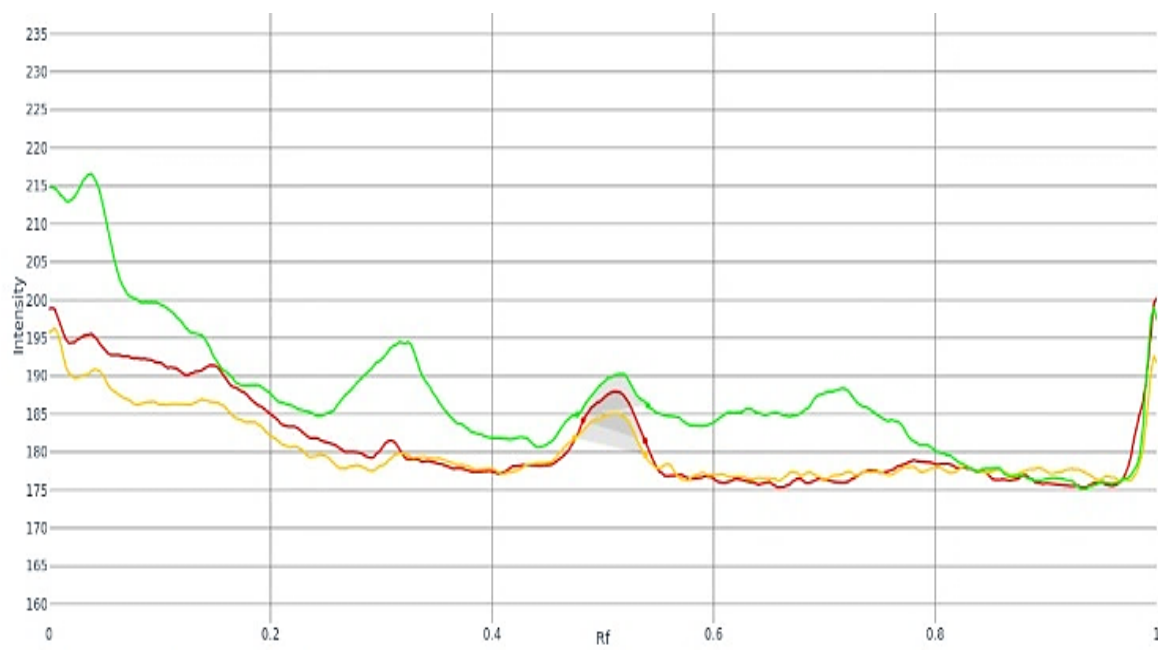
***A.**

***B.**

Anexo 18. Derivatización evaluación de exactitud en TLC, inmersión en reactivo AgNO₃ 0.12 M (140°C).

*A. Visualización en tono sepia de la placa cromatográfica.

*B. Visualización sin ajuste de color de la placa cromatográfica.



Anexo 19. Densitograma de la evaluación de exactitud por el método de densitometría con TLC (40 mg L^{-1}).



Anexo 20. Bulbos de ajo en fresco triturado para la cuantificación de clorpirifos.



Anexo 21. Bulbo de ajo Napurí.



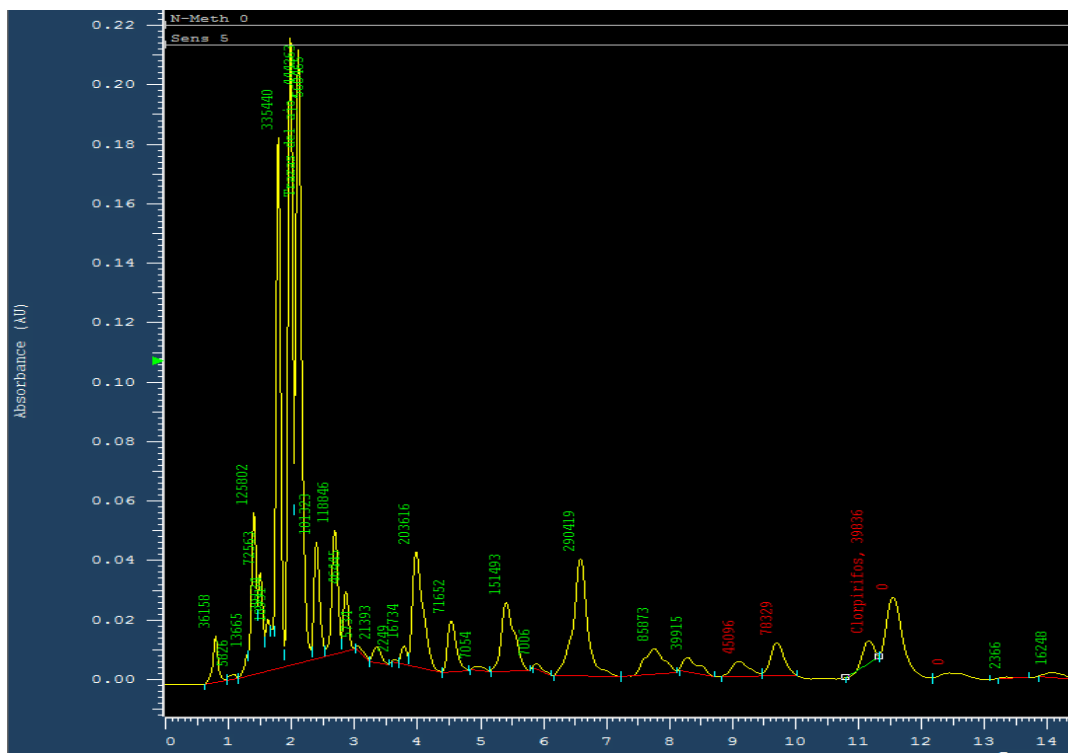
Anexo 22. Bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS.



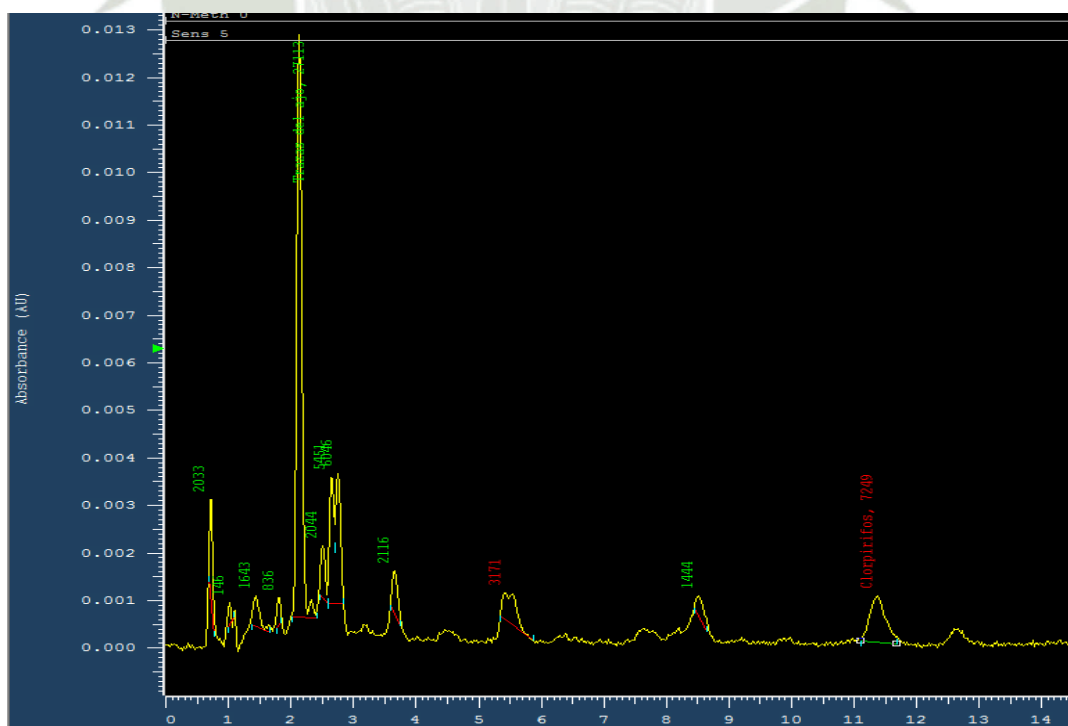
Anexo 23. Bulbo de ajo Arequipeño.



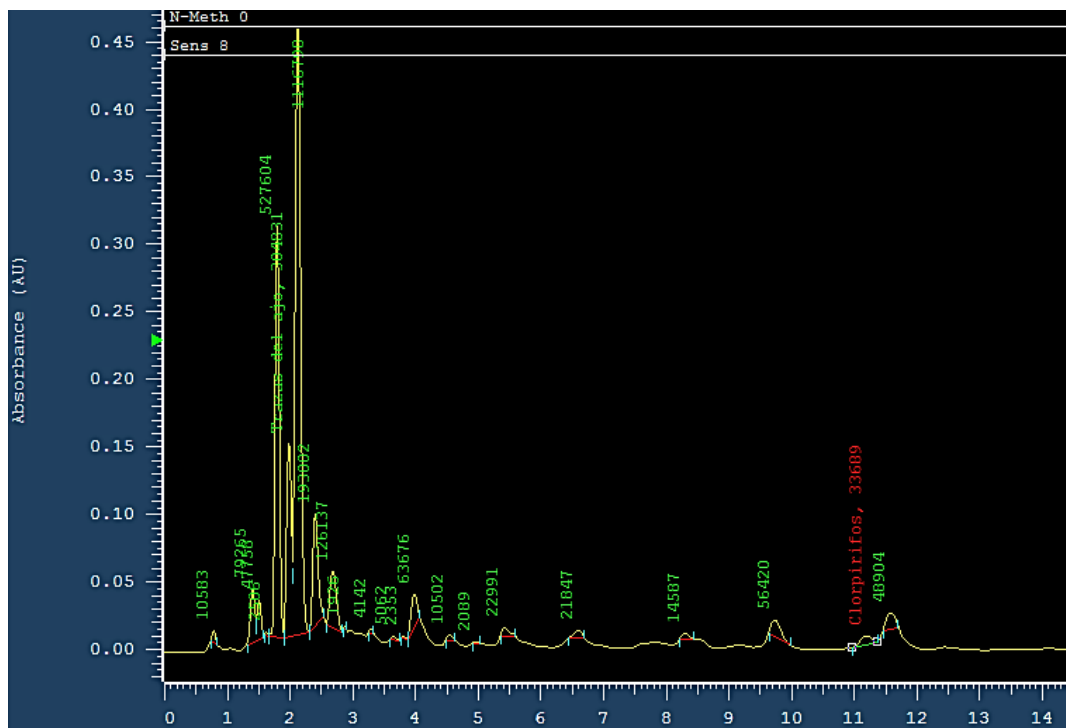
Anexo 24. Bulbo de ajo Chino.



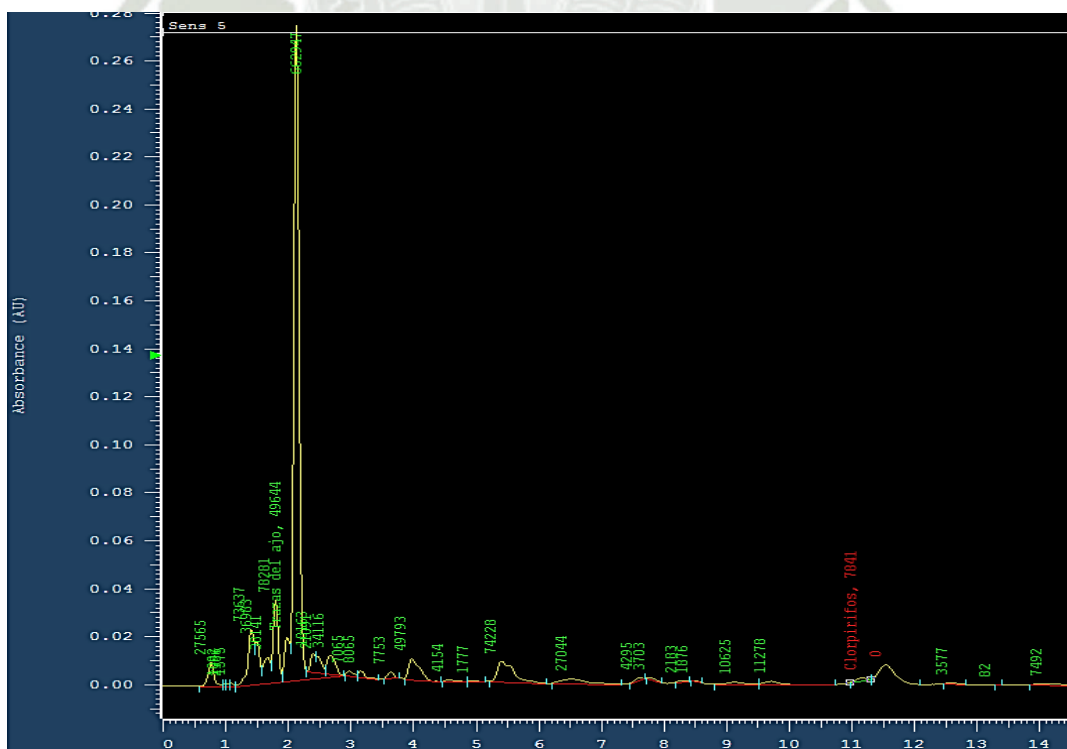
Anexo 25. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Napurí del mercado Acomare.



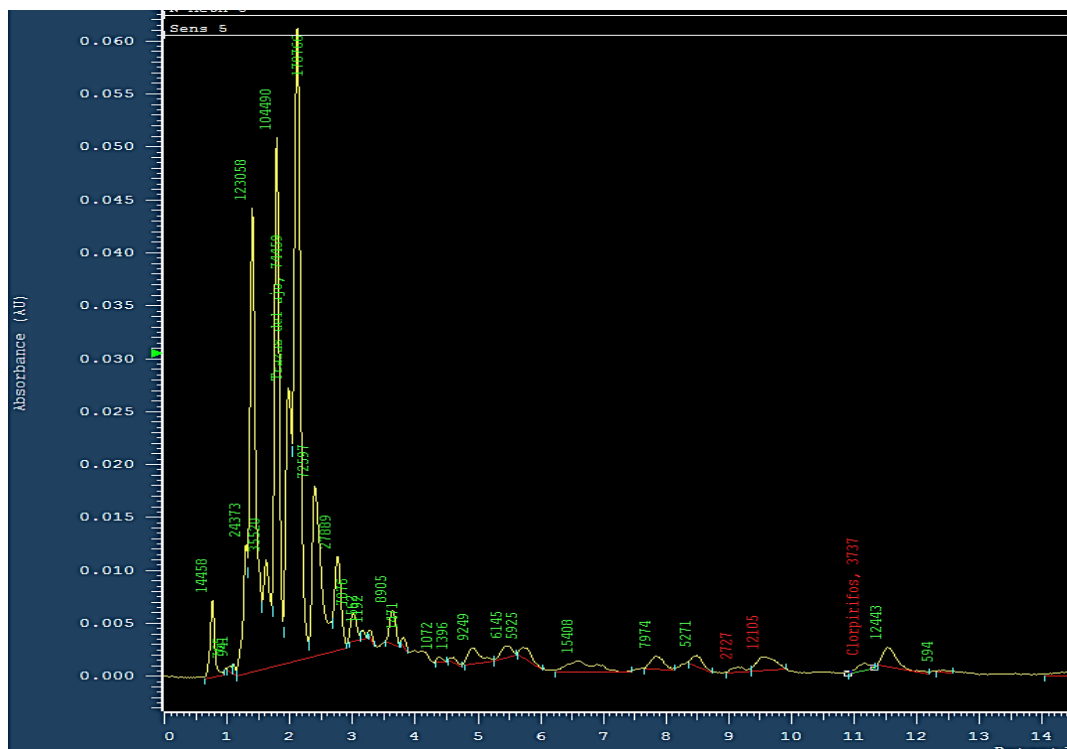
Anexo 26. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS del mercado de Señor de Huanca.



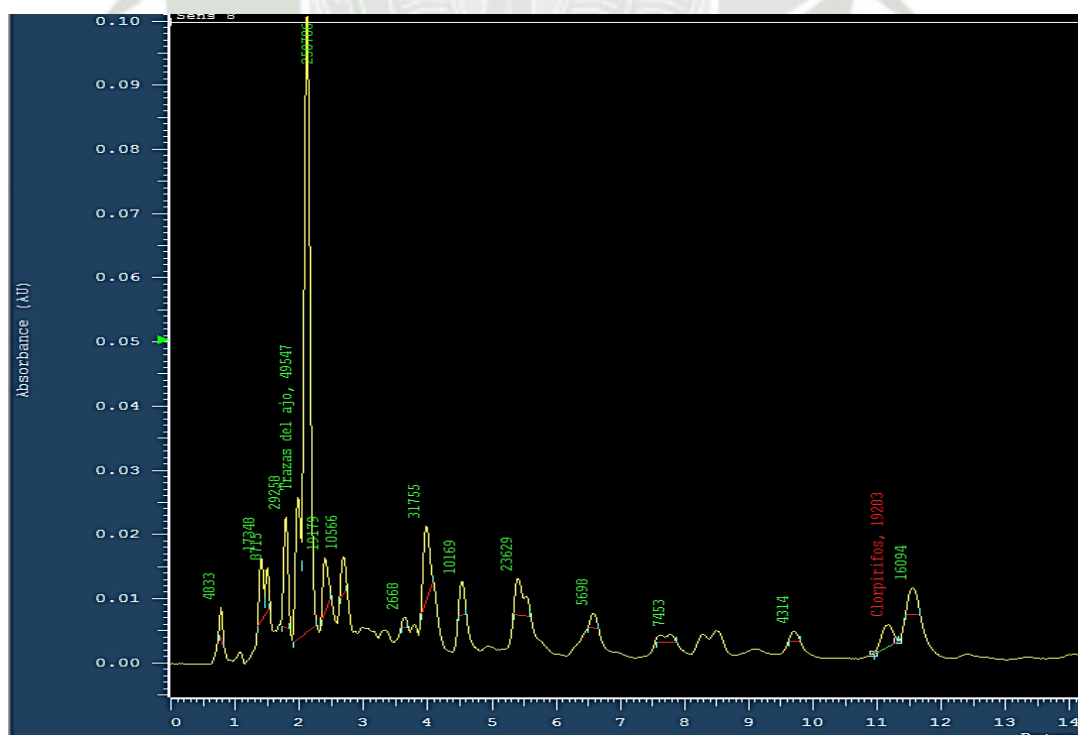
Anexo 27. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo INIA 105 DONAJUS del mercado Acomare.



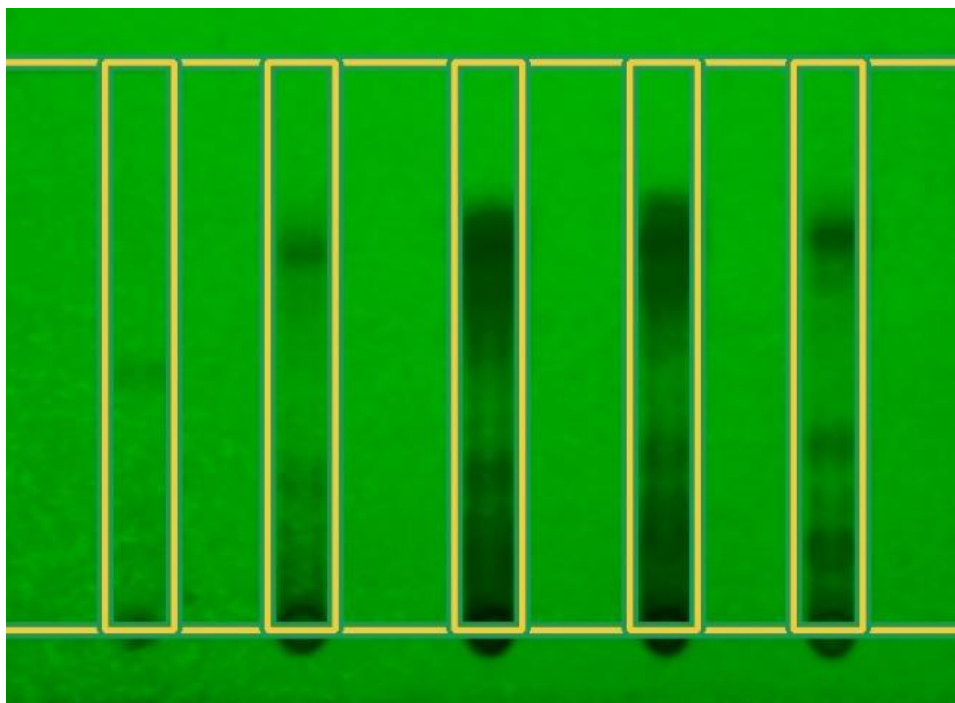
Anexo 28. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Chino del mercado de Señor de Huanca.



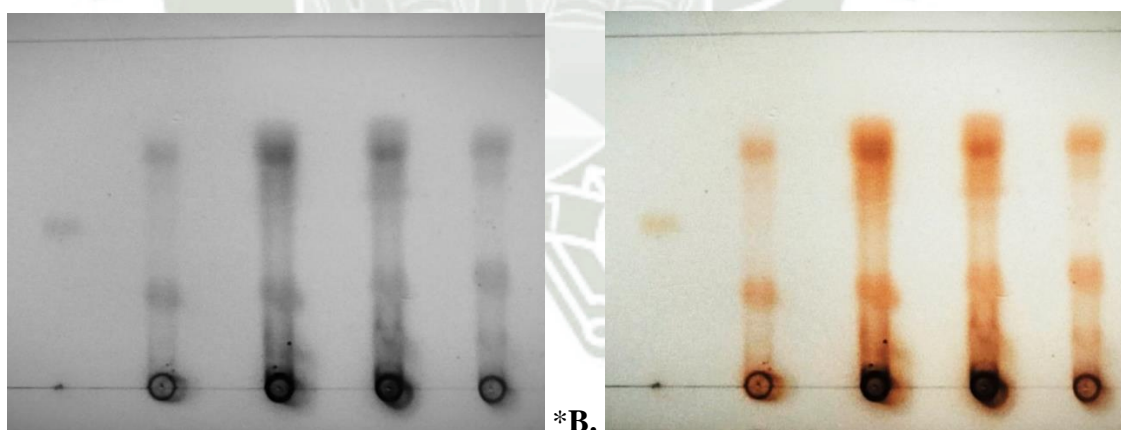
Anexo 29. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Arequipeño del mercado Acomare.



Anexo 30. Clorpirifos cuantificado por el método de HPLC en bulbo de ajo Arequipeño del mercado Río Seco.



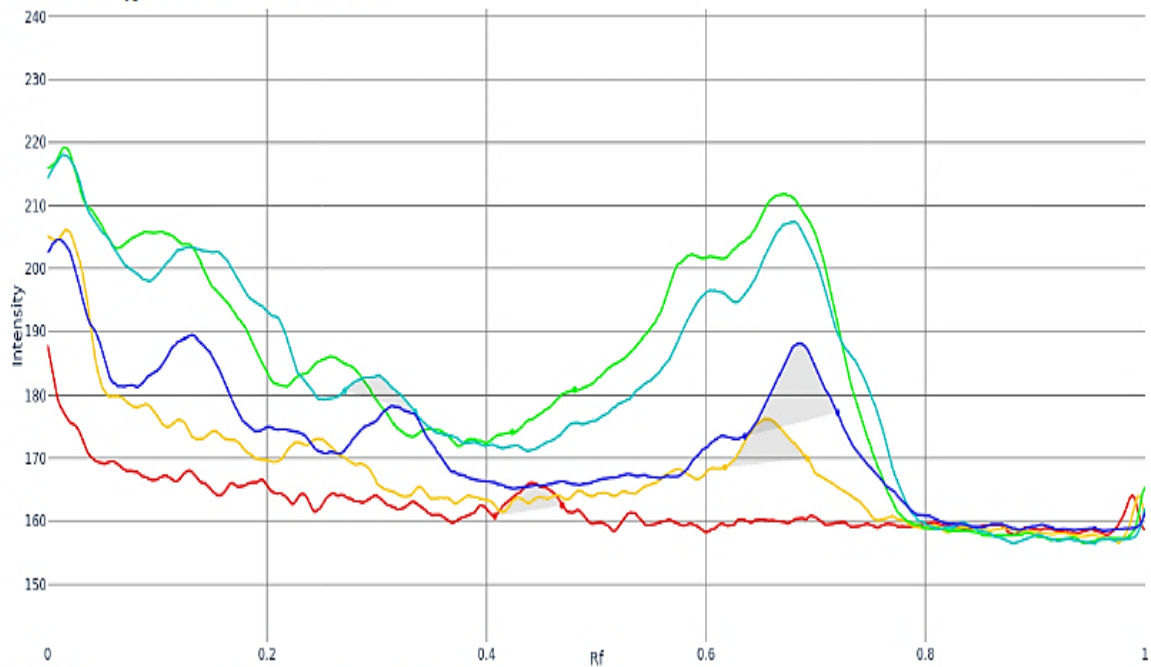
Anexo 31. Visualización UV (254 nm) bulbos de ajo muestreados en mercados de la ciudad de Arequipa por el método de densitometría con TLC.



Anexo 32. Muestras de ajo sembrados por el método de densitometría con TLC y derivatización con el reactivo AgNO_3 0.12 M (140°C).

*A. Visualización en tono sepia de la placa cromatográfica

*B. Visualización sin ajuste de color de la placa cromatográfica



Anexo 33. Densitograma de bulbos de ajo muestreados de mercados dentro de la ciudad de Arequipa por el método de densitometría con TLC.

