

QuEChERS en la determinación de fipronil y sus compuestos de degradación

Judith Amador-Hernández*, Miguel Velázquez-Manzanares, Edith M. Colunga-Urbina,
Iliana M. de la Garza-Rodríguez y Eduardo E. Reyes-Sánchez
Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Coahuila
Saltillo, Coah.; México
[judith.amador, miguel_velazquez, ecolunga, ilianagarza, eduardo.reyes]@uadec.edu.mx

Abstract— Fipronil is a broad-spectrum insecticide for agricultural, urban and veterinary use, whose use is not recommended in animals for human consumption due to the risk posed by its intake. On the other hand, QhEChERS has highlighted as a simple and fast technique in the treatment of samples for the determination of pesticides by diverse instrumental techniques of analyses. In this work, they are briefly discussed main characteristics of fipronil, QhEChERS and its application in the determination of this insecticide and its main degradation products.

Keyword— *QuEChERS, fipronil, extraction, analysis, soil, food.*

Resumen— El fipronil es un insecticida de amplio espectro de uso agrícola, urbano y veterinario, cuya utilización no se recomienda en animales para consumo humano debido al riesgo que representa su ingesta. Por otro lado, en los últimos años QhEChERS ha destacado como una técnica simple y rápida en el tratamiento de muestras para la determinación de plaguicidas por muy diversas técnicas de instrumentación analítica. En este trabajo, se discuten brevemente las principales características del fipronil, para dar paso a QhEChERS y su aplicación en la determinación de este insecticida y sus principales productos de degradación.

Palabras claves— *QuEChERS, fipronil, extracción, análisis, suelo, alimentos.*

*A quien debe dirigirse la correspondencia.

I. INTRODUCCIÓN

Ante el aumento de la población, el hombre se ve en la necesidad de incrementar significativamente la producción de alimentos. Por ello, a lo largo de la historia ha utilizado plaguicidas para proteger a sus cultivos y ganado de plagas o enfermedades que afectan la obtención de productos destinados a la alimentación.

En sus inicios, los plaguicidas eran de origen natural. Sin embargo, el avance de la ciencia y la tecnología química ha permitido la síntesis y producción en gran escala de plaguicidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT) o el hexacloruro de benceno (endrina) para atender las demandas de la Sociedad en el combate de organismos nocivos. Desafortunadamente, la falta de información sobre su toxicidad, así como su uso desmedido en el ambiente, provocaron intoxicaciones crónicas y/o agudas en el ser humano y otros organismos pertenecientes a distintos ecosistemas, llevando a su prohibición y reemplazo.

Así, hoy en día existe una búsqueda permanente por la síntesis o descubrimiento de nuevos plaguicidas, sobre los cuales es necesario conocer su modo de acción, toxicidad en organismos no blanco, persistencia en el ambiente, así como su residualidad en alimentos, para reconocer riesgos en la salud del ser humano. En este trabajo, se presenta el fipronil a través de sus principales propiedades fisicoquímicas y toxicológicas, para dar paso a la descripción de QuEChERS (quick, easy, cheap,

effective, rugged, safe) y sus ventajas en el tratamiento de muestra, finalizando con el análisis de los métodos donde se cuantifica fipronil por esta técnica de separación.

II. FIPRONIL

El fipronil es un insecticida sintético de amplio espectro, de la familia de los fenil pirazoles (véase Figura 1); fue descubierto en 1985 por Rhone-Poulenc Agro, para iniciar su comercialización en 1993 [1]. Actualmente existe en el mercado en diversas presentaciones comerciales de uso agrícola, urbano, veterinario y de libre venta, ya que se destina al control de insectos como hormigas, escarabajos, cucarachas, pulgas, garrapatas, termitas, gorgojos, ácaros, entre otros (Figura 2). En algunos países está prohibido su uso en cultivos y animales para consumo humano ya que sus residuos se acumulan en tejido graso y vísceras [2].

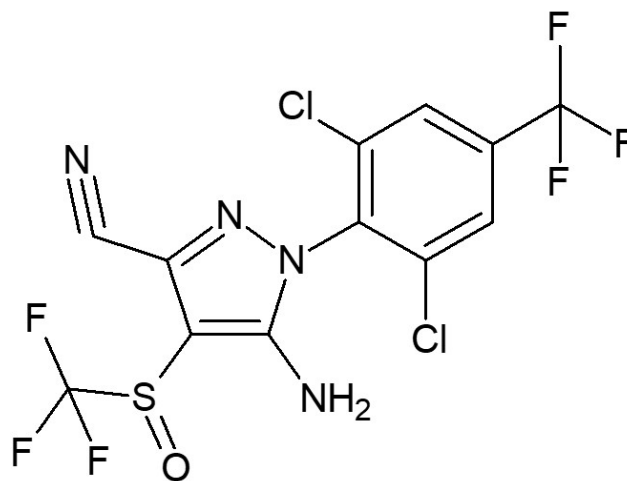


Fig. 1. Estructura química del fipronil (elaboración propia).

Este compuesto tiene gran actividad insecticida y baja toxicidad en mamíferos. Si bien altera la función de los receptores GABA_A (ácido α -aminobutírico), neurotransmisores del sistema nervioso central de los mamíferos [3], su mecanismo de acción se centra en el bloqueo de los canales de cloruro regulados por glutamato en los invertebrados [4] (Zhao, Yeh, Salgado, & Narahashi, 2004). En los mamíferos, puede presentarse intoxicación crónica por ingesta o inhalación [5].

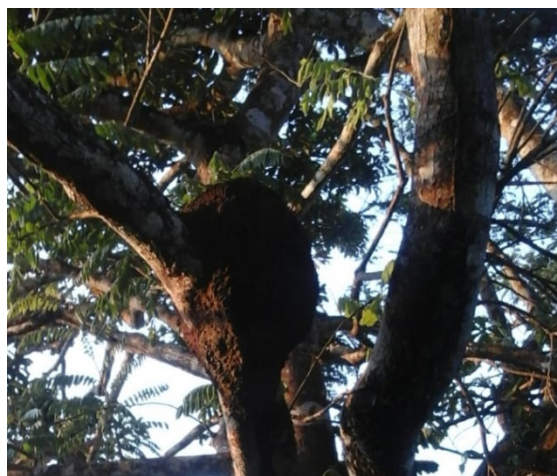


Fig. 2. Fipronil, un insecticida efectivo en el combate de termitas.

En relación con el ser humano, la toxicidad del fipronil reside en su afectación al sistema nervioso central, tal como se ha observado en otras especies [6]. En un reporte de seis casos de envenenamiento accidental con este plaguicida en seres humanos, se identifican como principales síntomas vómitos, agitación y convulsiones, con evolución favorable [7]. Al día de hoy no hay evidencia significativa de efectos carcinogénicos, teratogénicos o reproductivos por exposición a este compuesto.

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, el fipronil tiene una solubilidad baja en agua (2 mg L^{-1}), siendo soluble en disolventes orgánicos como cloruro de metileno o tolueno. Su constante de partición es alta ($\log P_o/w = 4$), del mismo orden que otros contaminantes prioritarios como los hidrocarburos policíclicos aromáticos [1]. Se hidroliza rápidamente en agua en medio alcalino, siendo su tiempo de vida media de 770 h a pH 9 y de 2.4 h a pH 12 [8]. Su permanencia en suelo depende directamente de la cantidad de materia orgánica presente; su tiempo de vida media es mayor a 100 días en este compartimento ambiental [1].

Su solubilidad baja en agua y su alto carácter lipofílico hace que sea poco probable encontrar este insecticida en cuerpos de agua [9]. Por otro lado, con una constante de Henry de $6.60 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$ se predice que el fipronil y sus metabolitos no se disipan en aire por sí mismos, pero la aplicación del insecticida en aerosol o por aspersión puede generar que viaje a la deriva por su adsorción al material particulado [10].

En un ecosistema, existen distintos mecanismos de degradación del fipronil, en función del compartimento en que se encuentre y de las condiciones ambientales. En el suelo, se degrada por acción de la luz solar en los primeros 10 cm y se produce fipronil-desulfino; por hidrólisis y en condiciones alcalinas se produce fipronil-amida, mientras que por medios oxidativos cerca de la superficie se produce fipronil-sulfona. Debajo de la capa superficial del suelo, se forma fipronil-sulfuro en medios reductores. El tiempo de vida media de los productos de degradación en el suelo alcanza hasta 350 días [9, 10].

El fipronil despertó el interés de la comunidad científica internacional en agosto de 2017, cuando la Comunidad Europea emitió una alerta sobre la presencia de fipronil en huevos en 15 países de la Comunidad Europea, así como Suiza y Hong Kong; el problema fue identificado inicialmente en Bélgica [11]. Si bien el insecticida no está autorizado para su uso en animales de consumo humano, se presume que fue usado en granjas avícolas para atender plagas de *Dermanyssus gallinae*, un ectoparásito, hecho que provocó su presencia en huevos por arriba de su valor permitido de $20 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ como Límite Máximo Residual [12]. Tan sólo en Gran Bretaña el problema representó retirar del mercado más de 700 000 huevos potencialmente contaminados con este plaguicida, o bien unos 250 000 en Francia. Además, alimentos procesados que contenían huevo también fueron retirados y revisados en cuanto a su contenido en fipronil [13].

Ante tal evento, es evidente la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos para la determinación de plaguicidas como el fipronil en distintos tipos de muestra, partiendo de una técnica de extracción rápida, de bajo costo y amigable con el ambiente. Así, el análisis rutinario de gran cantidad de muestras es económica y operativamente factible, además de basarse en los principios de la Química Analítica Verde que busca promover su sustentabilidad.

III. QUeChERS

QuEChERS es el acrónimo acuñado para nombrar una técnica de preparación de muestra destinada a la extracción simultánea, no selectiva, de múltiples residuos de compuestos orgánicos en muestras complejas.

El término fue propuesto por primera vez por Lehotay, Mastovska y Schenck [14]. Tal iniciativa surge de la necesidad de contar con un método general que permitiese la determinación simultánea de múltiples residuos de plaguicidas en frutas y vegetales, aun cuando éstos presentasen polaridad muy distinta debido a sus diferencias en cuanto a estructuras químicas. Décadas antes, Mills, Onley y Gaither [15] ya habían desarrollado un método multiresiduo (MRM, Multiple Residue Method) para la determinación de plaguicidas organoclorados no polares, el cual fue evolucionando con el fin de incrementar los grupos de plaguicidas susceptibles de cuantificar.

Así, Anastassiades, Lehotay, Stanjbaheer y Schenck [16] desarrollaron QuEChERS como un MRM que involucrase la extracción con disolventes, seguida de una extracción en fase sólida dispersa, para la recuperación eficiente de plaguicidas de distinta polaridad. Además de incrementarse los porcentajes de recobro de ciertos compuestos respecto a otros MRM propuestos hasta entonces, lograron que su procedimiento fuese fácil y rápido de implementar, con reactivos menos tóxicos que los usados hasta entonces y en menor cantidad, reduciéndose también el costo de tratamiento por muestra.

De esta manera, la combinación de QuEChERS con técnicas cromatográficas permitió mejorar los límites de detección alcanzados en la cuantificación simultánea de plaguicidas de muy diversa índole, incrementar la confiabilidad de los resultados por ser más exactos y precisos, además de atender a una necesidad imperante de la Química Analítica de contaminar menos en su ejercicio para evaluar la contaminación química en el ambiente [17]. Asimismo, las características de QuEChERS atendían a las estrategias propuestas por Namiesnik [18] para darle un carácter verde o ambientalmente benigno a la Química Analítica.

Actualmente, QuEChERS ha pasado de ser un MRM para cuantificar plaguicidas en frutas y vegetales, a constituirse en una técnica que permite la determinación de muy diversos compuestos en distintos tipos de muestra, tales como contaminantes prioritarios en bivalvos [19], micotoxinas en cereales [20], disruptores endócrinos en peces [21], hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelo [22], entre otros.

En general, la técnica consiste en tres etapas [23]:

1. Preparación de la matriz de la muestra. Si es una muestra sólida, se pesa seca y se fragmenta o muele, para facilitar la lixiviación del analito; si la muestra es líquida, se mide su volumen. Si el analito es un ácido o base, suele ser necesario ajustar el pH del medio.
2. Extracción con disolventes y partición favorecida por adición de sales. Implica la adición de disolventes como acetonitrilo en volúmenes menores a 20 mL, seguida de la adición de sales como sulfato de magnesio y cloruro de sodio en cantidades del orden de gramos. Se agita la mezcla con vórtex o ultrasonido, para después separar las fases por centrifugación.
3. Limpieza del extracto. Una vez recuperada la fase extractante, se suele añadir un sólido como adsorbente para eliminar interferentes químicos, el cual puede separarse por filtración o centrifugación. El filtrado o sobrenadante puede someterse a técnicas adicionales de tratamiento de muestra, o recuperarse para su introducción al instrumento de análisis.

El procedimiento es simple, tal y como puede apreciarse en la Figura 3, lo que constituye una gran ventaja de QuEChERS frente a otras técnicas de tratamiento de muestra, ya que cada operación

adicional complica el procedimiento y es también una fuente potencial de errores sistemáticos y aleatorios [24].

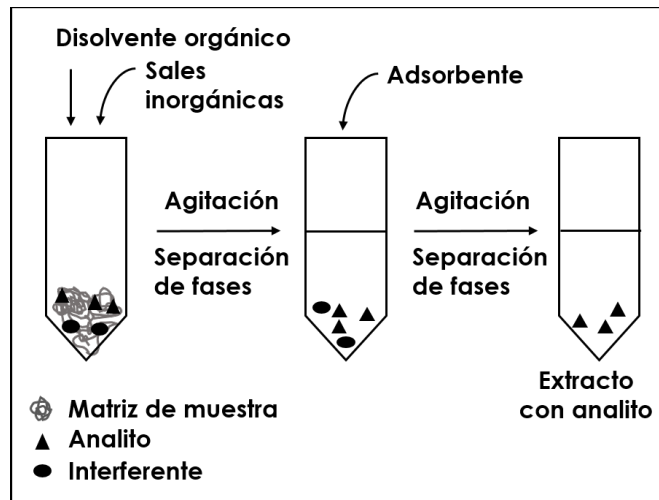


Fig. 3. QuEChERS en el tratamiento de muestras para análisis.

IV. QUECHERS EN LA DETERMINACIÓN DE FIPRONIL

En la actualidad, la mayoría de los métodos con QuEChERS en los que se considera la determinación de fipronil (con o sin metabolitos), son MRM. En la Figura 4 puede reconocerse la distribución en el tiempo de las 132 publicaciones enlistadas en Scifinder® a mayo de 2018, que corresponden a MRM con fipronil entre los analitos. Destaca que a partir de 2008 se incluye este plaguicida en este tipo de estudios, además de que el mayor número de publicaciones en este ámbito aparecen entre 2014 y 2016.

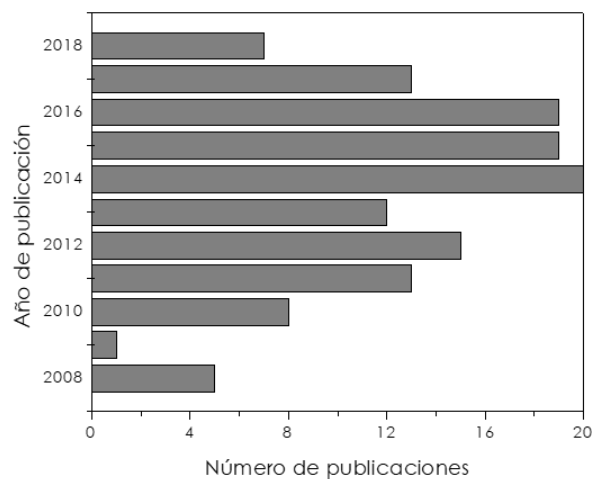


Fig. 4. MRM con fipronil entre los analitos, publicados a mayo del 2018.

De estos trabajos, el 11 % reporta el uso de cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) y cromatografía de líquidos (LC, por sus siglas en inglés), ambas con detección por espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) en sus muy diversas modalidades. Por otro lado, en el 47 % de los trabajos se utiliza GC-MS, mientras que en el 39 % se reporta sólo el uso de LC-MS. El 3 % restante

consiste en trabajos aislados con cromatografía de fluidos supercríticos-MS, GC con detector de captura de electrones, o GC con detector de captura de electrones y detector de nitrógeno fósforo en serie. Sin duda, el uso de técnicas cromatográficas en combinación con MS como técnica de detección incrementa sustancialmente la selectividad del proceso analítico, una necesidad inherente a este tipo de análisis.

A continuación, se integran los métodos analíticos desarrollados para determinar fipronil en los que se utiliza QuEChERS, con GC (Tabla I) o LC (Tabla II) como técnica de detección.

Tabla I. Aplicaciones de QuEChERS en la determinación de fipronil y otros compuestos por GC.

<i>Analito</i>	<i>Muestra</i>	<i>Extracción</i>	<i>Limpieza de muestra</i>	<i>Exactitud¹</i>	<i>Técnica analítica</i>	<i>LC²</i>	<i>Ref.</i>
Fipronil Atrazina Endosulfan	10 g agua o sedimento	10 mL ACN ³ , 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	300 mg PSA ⁴ , 330 mg C ₁₈ , MgSO ₄	72±5 a 116±8 48±15 a 111±8 63±12 a 80±2	GC/MS	0.01 0.05 0.01	[25]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	10 g vegetales o suelo	10 mL ACOET ⁵ , 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	100 mg PSA, 600 mg MgSO ₄	90.75±2.03 a 100.24±1.93 91.20±2.56 a 106.59±4.77 91.01±2.59 a 103.51±4.88 91.92±5.33 a 08.78±3.49	GC/MS	0.01	[26]
Fipronil Acrinatrina kresomix-m Piridaben	15 g legumbres	15 mL CH ₃ COOH 1%/ACN, 6 g MgSO ₄ , 1.5 g NaCH ₃ COO	250 mg PSA, 750 mg MgSO ₄	91 a 93 83 a 101 77 a 96 79 a 98	GC-ECD	0.01 0.01 0.01 0.05	[27]
Fipronil Clorfenvinpos Cipermetrin	2 g carne o grasa bovina	4 mL ACN, 1.6 g MgSO ₄ , 0.4 g NaCl	80 mg C ₁₈ , 80 mg PSA, 150 mg MgSO ₄	70±1 a 112±6 87±27 a 129±5 78±9 a 128±27	GC/MS	0.01 carne, 0.1 grasa	[28]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil F. Amina	15 g vegetales	30 mL ACOET, 10 g NaCl, 10 g Na ₂ SO ₄	150 mg PSA, 900 mg MgSO ₄ , 50 mg GCB ⁶	86.1 a 92.0 85.1 a 93.8 86.0 a 95.7 88.17 a 93.45 85.75 a 93.17	GC/MS	0.03	[29]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	20 g coliflor o suelo	5-10 g NaSO ₄ , 20 mL Acetona, 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	75 mg PSA, 150 MgSO ₄	>80	GC- MS/MS	0.003	[30]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	15 g frutas cítricas, 10 g suelo	30 mL ACN, 3 g NaCl, 9 g NaSO ₄ (fruta)	400 mg PSA, 1200 MgSO ₄ (fruta)	90.5 (fruta) 89.0 (fruta) 89.5 (fruta) 87.0 (fruta)	GC-ECD ⁷	0.001 fruta y 0.005 suelo	[31]
Fipronil Metil- clorpirifos Imidacloprida	10 g dátiles	10 mL CH ₃ COOH 1%/ACN, 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	25 mg PSA, 150 mg MgSO ₄ , 10 mg GCB	86.30±2.15 a 93.80±2.35 91.71±2.29 a 98.15±2.45 89.70±2.24 a 92.50±2.31	GC-FID	-	[32]

¹ Promedio de recobro, en porcentaje ± incertidumbre; ² límite de cuantificación, en mg Kg⁻¹ o L⁻¹; ³ acetonitrilo; ⁴ amina primaria/secundaria; ⁵ acetato de etilo, ⁶ grafito de carbón negro, ⁷ detector de captura de electrones

Tabla II. Aplicaciones de QuEChERS en la determinación de fipronil y otros compuestos por LC.

<i>Analito</i>	<i>Muestra</i>	<i>Extracción</i>	<i>Limpieza de muestra</i>	<i>Exactitud</i>	<i>Técnica analítica</i>	<i>LC</i>	<i>Ref.</i>
Fipronil	5 g miel	10 mL H ₂ O, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄	-	76.3 a 87.7	LC-DAD ¹	0.6	[33]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	10 g suelo, 5-10 g maíz	5 mL H ₂ O, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	20-30 mg C ₁₈ , 30-50 mg PSA, 20 mg GCB, 150 mg MgSO ₄	93.4 a 104.6 88.9 a 102.7 82.4 a 99.8 87.5 a 103.6	UPLC ² -MS/MS	0.005, 0.010 (paja)	[34]
Fipronil Imidacloprida, Piraclostrobin, Azoxistrobin	4-10 g azufaiifa de invierno	20 mL ACN, 2 g NaCl	30 mg PSA	87.5 a 106.1 97.2 a 102.4 86.8 a 116.2 87.7 a 100.6	LC-MS/MS	0.01 0.2 0.02 0.02	[35]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	10 g suelo, 5 g cacahuate	5 mL HCOOH 0.1%, 10-20 mL ACN, 3 g NaCl	50 mg PSA	66±8 a 115±3 71±7 a 107±3 68.9±1 a 12±5 76±3 a 106±9	LC-MS/MS	0.001	[36]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	5 g algodón, 10 g suelo	2-10 mL H ₂ O, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 2 g NaCl	30 mg PSA, 150 mg MgSO ₄	82.9±9.7 a 103.3±3.8 81.8±5.6 a 108.5±5.2 78.6±6.0 a 108.9±10.5 79.7±3.5 a 105.6±13.7	UPLC-MS/MS	0.005 a 0.01	[37]
Fipronil Fonicamida	5-15 g algodón	15 mL CH ₃ COOH 1%/ACN, 6 g MgSO ₄ , 1.5 g CH ₃ COONa	300 mg PSA, 900 mg MgSO ₄	79±1 a 104±1 84±1 a 103±2	LC-MS/MS	0.001 0.004	[38]
Fipronil Fonicamida	10 g suelo	20 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl	250 mg PSA, 1500 mg MgSO ₄	76±94 a 84±3 87±5 a 97±1	LC-MS/MS	0.006 0.002	[38]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil Tiametoxam Clotianidina Piraclostrobina	10 g vegetales, frutas o granos	5 mL H ₂ O, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 2 g NaCl	150 mg MgSO ₄ , 50 mg C ₁₈	85.8 a 106.8 84.8 a 110.6 79.3 a 103.2 88.2 a 106.2 73.6 a 103.8 81.2 a 103.6 83.8 a 105.3	LC-MS/MS	0.01	[39]
Fipronil F. Sulfona F. Sulfuro F. Desulfinitil	2.5 g té o crisantemo	5 mL H ₂ O, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 2 g NaCl	200 mg PSA, 100 mg C ₁₈ , 10 mg CNT ³	86 a 112 88 a 103 88 a 107 88 a 106	UPLC-MS	0.002	[40]
Fipronil y otros 5 plaguicidas	2 g miel o jalea real	5 mL K ₂ HPO ₄ 0.2 M pH 9, 12 mL ACN, 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g CitNa ₃ ⁴ , 0.5 g CitNa ₂ H ⁵	150 mg PSA, 150 mg C ₁₈ , 900 mg MgSO ₄	85 ± 2	LC-MS/MS	0.001	[41]

¹ Cromatografía de líquidos con detección por diodos en fila; ² Cromatografía de líquidos ultra-rápida; ³ nanotubos de carbono; ⁴ citrato de sodio; ⁵ citrato ácido de sodio.

El incremento en el uso de fipronil contra cada vez más organismos, además de la necesidad de cuantificarlo para reconocer su toxicidad y riesgos en la salud por exposición a través de distintas vías,

motivan la búsqueda continua de nuevos métodos analíticos para determinar este plaguicida por técnicas tan eficientes como QuEChERS, en combinación con técnicas cromatográficas para asegurar una sensibilidad y selectividad apropiadas. A diferencia de los MRM, estos métodos se han desarrollado buscando la máxima recuperación de fipronil para una mayor exactitud y precisión de los resultados, asegurando así la confiabilidad de la información química.

Como puede observarse, el disolvente más utilizado es el acetonitrilo, con recobros superiores al 70% y límites de cuantificación en el orden de $\mu\text{g Kg}^{-1}$, siendo apropiados para identificar si su concentración en alimentos excede el Límite Máximo Residual. Por otro lado, en la mayoría de los casos se usan técnicas cromatográficas con MS en la detección, con el fin de asegurar la selectividad del análisis.

V. CONCLUSIONES

QuEChERS es una técnica de extracción muy versátil en el análisis de muestras sólidas o líquidas, orientada a separar especies químicas a nivel de trazas con buen rendimiento, bajo consumo de reactivos y tiempo de operación reducido. En los últimos años, se ha incrementado el desarrollo de métodos analíticos basados en QuEChERS y técnicas cromatográficas para la determinación de fipronil, ya sea como MRM para cuantificar simultáneamente múltiples compuestos orgánicos, o como métodos especialmente dirigidos a la cuantificación de este plaguicida y sus metabolitos. Estos últimos son de especial importancia para cuantificar estas especies con gran exactitud y precisión, ya que coadyuvan a la búsqueda de evidencia significativa por efectos carcinogénicos, teratogénicos o reproductivos ante exposición crónica o aguda. Si estos efectos se descartan, es indudable que el fipronil será un insecticida cada vez más utilizado en la Sociedad por no crear resistencia en organismos blanco.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACyT el apoyo económico brindado para la realización de estudios de posgrado (beca 621766).

REFERENCIAS

- [1] U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. 1996. New pesticide fact sheet – Fipronil, EPA-737-F-96-005, U.S. Government Printing Office Washington, pp 1-10.
- [2] McMahan, R.L., Strynar, M.J., Dagnino, S., Herr, D.W., Moser, V.C., Garantziotis, S., Andersen, E.M., Freeborn, D.L., McMillan, L., & Lindstrom, A.B. (2015). Identification of fipronil metabolites by time-of-flight mass spectrometry for application in a human exposure study. *Environment International*, 78, 16–23.
- [3] Ikeda, T., Nagata, K., Kono, Y., Yeh, J.Z., & Narahashi, T. (2004). Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents. *Pest Management Science*, 60(5), 487-492.
- [4] Zhao, X., Yeh, J.Z., Salgado, V.L., & Narahashi, T. (2004). Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1), 192-201.
- [5] Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., & King, W.J. 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 176, 1-66.
- [6] Suzuki, A., Aoki, A., Fujiwara, M., Koto, O., & Akiyama, M. (2012). GABA A receptor antagonistic insecticide fipronil: overview of toxicological studies. *Journal of Pesticide Science*, 37(4), 349-361.

- [7] Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., & Eddleston, M. (2004). Acute human self-poisoning with the n-phenylpyrazole insecticide fipronil—A GABAA-gated chloride channel blocker. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(7), 955–963.
- [8] Bobé, A., Meallier, P., Cooper, J.F., & Coste, C.M. (1998). Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hydrolysis and photolysis). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2834-2839.
- [9] Aajoud, A., Ravanel, P., & Tissut, M. (2003). Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1347-1352.
- [10] Ngim, K.K., & Crosby, D.G. (2000). Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(5), 972-977. J. Clerk Maxwell, *A Treatise on Electricity and Magnetism*, 3rd ed., vol. 2. Oxford: Clarendon, 1892, pp.68–73.
- [11] Muñoz-Piñero, M.A., & Robouch, P. (2018). Fipronil in eggs. Factsheet. EU Science Hub. Recuperado de http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC110632/jrc110632_final.pdf.
- [12] FAO. (2002). Fipronil. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation01/08_Fipronil.pdf.
- [13] Boffey, D., & Connolly, K. (August 11th, 2017). Egg contamination scandal widens as 15 EU states, Switzerland and Hong Kong affected. *The Guardian*. pp 1.
- [14] Lehotay, S.J., Mastovska, K., & Schenck, F.J. (2003). New developments in the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe approach to pesticide residue analysis. Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, March 23-27.
- [15] Mills, P.A., Onley, J.H., & Gaither, R.A. (1963). Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, 46, 186–191.
- [16] Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stanjbaher, D., & Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431.
- [17] Anastas, P. T. (1999). Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167–175.
- [18] Namiesnik, J. J. (2001). Green analytical chemistry—Some remarks. *Journal of Separation Science*, 24(2), 151-153.
- [19] Chiesa, L.M., Nobile, M., Malandra, R., Pessina, D., Panseri, S., Labella, G.F., & Arioli, F. (2018). Food safety traits of mussels and clams: distribution of PCBs, PBDEs, OCPs, PAHs and PFASs in sample from different areas using HRMS-Orbitrap and modified QuEChERS extraction followed by GC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants, Part A*, in press.
- [20] Andrade, G.C.R.M., Pimpinato, R.F., Francisco, J.G., Monteiro, S.H., Calori-Domingues, M.A., & Tornisielo, V.L. (2018). Evaluation of mycotoxins and their estimated daily intake in popcorn and cornflakes using LC-MS techniques. *LWT--Food Science and Technology*, in press.
- [21] Luo, Z., Lu, J., Li, H., Tu, Y., Wan, Y., & Yang, Z. (2018). Air-assisted liquid-liquid microextraction integrated with QuEChERS for determining endocrine-disrupting compounds in fish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 260, 174-182.
- [22] Sobhi, H.R. (2015). GC/MS monitoring of selected PAHs in soil samples using ultrasound-assisted QuEChERS in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction. *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, 3(5), 288-292.
- [23] Pszczolińska, K., & Michel, M. (2016). The QuEChERS approach for the determination of pesticide residues in soil samples: an overview. *Journal of AOAC International*, 99(6), 1403-1414.
- [24] Wilkowska, A., & Biziuk, M. (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125(3), 803-812.

- [25] Brondi, S. H. G., de Macedo A. N., Vicente, G. H. L., Noriega, A. R. A. (2011). Evaluation of QuEChERS method and gas chromatography – mass spectrometry for analysis pesticide residues in water and sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 18-22.
- [26] Paramasivam, M., & Chandrasekaran, S. (2013). Determination of fipronil and its major metabolites in vegetables, fruit, and soil using QuEChERS and gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(11), 1203-1211.
- [27] Aguilera, A., Valverde, A., Camacho, F., Boulaïd, M., & Garcia-Fuentes, L. (2014). Household processing factors of acrinathrin, fipronil, kresoxim-methyl and pyridaben residues in green beans. *Food Control*, 35(1), 146-152.
- [28] Sartarelli, N. C., de Macedo, A. N., de Sousa, J. P., Nogueira, A. R. A., & Brondi, S. H. G. (2012). Determination of chlorfenvinphos, fipronil, and cypermethrin residues in meat and bovine fat using QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(13), 1895-1908.
- [29] Kaur, R., Mandal, K., Kumar, R., & Singh, B. (2015). Analytical method for determination of fipronil and its metabolites in vegetables using the Quechers method and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*. 98(2), 464-471.
- [30] Duhan, A., Kumari, B., & Duhan, S. (2015). Determination of residues of fipronil and its metabolites in cauliflower by using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(2), 260-266.
- [31] Aruna, M., Raju, R.M., & Reddy, K.N. (2016). Method validation and residues of fipronil and its metabolites in citrus fruit and soil on gas chromatography-ECD by QuEChERS method. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6(1), 184-193. Recuperado de: http://www.jcbcs.org/admin/get_filechem.php?id=396.
- [32] Abbassy, M. A., Salim, Y. M. M.; Shawir, M. S., & Nassar, A. M. K. (2017). Disappearance and hazard quotient of chlorpyrifos-methyl, fipronil, and imidacloprid insecticides from dates. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12(3), 223-230.
- [33] Tomasini, D., Sampaio, M.R.F., Cardoso, L.V., Caldas, S.S., Primel, E.G. (2011). Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction and the modified QuEChERS method for the determination of fipronil in honey by high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Analytical Methods*, 3(8), 1893-1900.
- [34] Cheng, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Meng, W., Liu, N., Chen, Z., Tao, Y., Zheng, Y. (2014). Simultaneous determination of fipronil and its major metabolites in corn and soil by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 6, 1788-1795.
- [35] Peng, W., Zhao, L., Liu, F., Xue, J., Li, H., & Shi, K. (2014). Effect of paste processing on residue levels of imidacloprid, pyraclostrobin, azoxystrobin and fipronil in winter jujube. *Food Additives & Contaminants, Part A*, 31(9), 1562-1567.
- [36] Li, M., Li, P., Wang, L., Feng, M., & Han, L. (2015). Determination and dissipation of fipronil and its metabolites in peanut and soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4435-4443.
- [37] Wu, X., Yu, Y., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Du, P., et al. (2017). Residue analysis and persistence evaluation of fipronil and its metabolites in cotton using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *PLoS One*, 12(3), e0173690.
- [38] Chawla, S., Gor, H.N., Patel, H.K., Parmar, K.D., Patel, A.R; Shukla, V., Ilyas, M., Parsai, S.K., Somashekar, et al. (2018). Validation, residue analysis, and risk assessment of fipronil and flonicamid in cotton (*Gossypium* sp.) samples and soil. *Environmental science and pollution research international*, in press.
- [39] Rong, L., Wu, X., Xu, J., Dong, F., Liu, X., Pan, X., et al. (2018). Simultaneous determination of three pesticides and their metabolites in unprocessed foods using ultraperformance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 35(2), 273-281.

- [40] Chen, H., Gao, G., Liu, P., Pan, M., Chai, Y., Liu, X., & Lu, C. (2018). Development and validation of an ultra performance liquid chromatography Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry for the determination of fipronil and its metabolites in tea and chrysanthemum. Food Chemistry, 246, 328-334.
- [41] Zheng, W., Park, J.A., Abd El-Aty, A. M., Kim, S.K., Cho, S.H., Choi, J., Yi, H., et al. (2018). Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 1072, 60-69.