

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS.



“DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE IMIDACLOPRID EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) Y FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE ASOCIADO A CALIBRACIÓN MULTIVARIADA”

Memoria para optar al Título Profesional de Químico.

CAMILA FERNANDA CID CABRERA

Director de tesis.

Dr. Edwar Fuentes P.

Santiago, Chile.

2014

*A mis padres,
Angélica y Osvaldo.*

AGRADECIMIENTOS.

Hay tantas personas que han contribuido a mi desarrollo tanto personal como profesional, tanta gente importante en mi vida que se hace difícil escribir estos agradecimientos sin que me embargue la emoción. Estoy muy agradecida de contar con tantas personas a las que quiero y respeto profundamente.

Agradezco principalmente a mi familia, que ha sido un pilar fundamental en mi vida, celebrando mis triunfos y acompañándome en mis penas y fracasos. Tengo que agradecer la paciencia enorme que han tenido, aguantando mis mañas y locuras. A mis padres, que con su amor incondicional y dedicación han hecho de mí la persona que soy hoy. A mis hermanos, Francisca y Osvaldo, que consienten mis mañas y son mis compañeros de locuras.

A mis abuelos, Mamita Isabel y Tata, que han formado la hermosa familia que tenemos. Como no agradecer las tardes de domingo, tomando once y conversando de la vida. A la Mamita Ruth, que es la persona más fuerte y valiente que he conocido, su ejemplo ha sido muy importante en mi vida.

Quiero agradecer a mis tías, que han sido un gran apoyo en todo este proceso. A la tía Chachi que con su ejemplo me ha enseñado la importancia de ser una gran profesional, a la tía Mena que es una gran mujer y un importante modelo de superación. A mi Nina, que me ha demostrado que con alegría y con el amor a los animales este mundo puede ser un lugar mejor.

A mis primos, que son mis segundos hermanos. La Nathy y el Guatón, que son mis hermanos mayores, sus consejos y apoyo han sido fundamentales a lo largo de mi vida. Al Chiris, Maca, Javi y Vicho, eternos compañeros de travesuras.

A mi Manu, compañero de vida en estos 8 años, que con su infinito amor y paciencia ha sido un apoyo fundamental a lo largo de todos estos años. A su familia, que desde el primer momento me recibieron como una integrante más.

Quiero agradecer a mis bebés hermosos. A mi silvestrito, que me cuida desde el cielo de los gatitos. A mi Busito y Mordelón, que hacen que mi vida sea cada día más feliz.

Agradezco también a todas aquellas personas que he conocido a lo largo de mi paso por la universidad, y que han contribuido a mi desarrollo tanto personal como profesional. A mis amigos de aula Nadia, Leslie, Carla, Pablo y tantos más, que hicieron que este camino fuera mucho más grato. A tantos compañeros de laboratorio; Francis, Luis, Vale, Mónica y Ricardo, hicieron que el trabajo dentro del laboratorio fuera algo mucho más entretenido. A mi buen amigo Javier, compañero de largos días de trabajo.

A mi tutor de tesis, el Profesor Edwar. Tengo que agradecer su gran dedicación para entregar sus conocimientos, disponibilidad para responder todas las dudas y para ayudar en todos los problemas que se presentaron en el laboratorio. Le agradezco la confianza que deposito en mí, la paciencia y la disponibilidad que tiene para dar un consejo y ofrecer su apoyo cuando es necesario. Agradezco a las Profesoras Maru y Jeanette, por sus enseñanzas y por las gratas conversaciones en el laboratorio.

Finalmente tengo que agradecer a todas las tías del aseo, guardias, técnicos y todas las personas que hacen que la universidad funcione, especialmente a la Sra. Anita, que con una sonrisa y una grata conversación hace que el trabajo sea mucho más agradable.

INDICE GENERAL.

INDICE DE FIGURAS.	iv
INDICE DE TABLAS.	vi
ABREVIATURAS.	viii
RESUMEN.	x
SUMMARY	xii
1- INTRODUCCION.	1
2- MARCO TEÓRICO.	4
2.1- Pesticidas neonicotinoides.	4
2.2- Historia y regulación de los pesticidas neonicotinoides.	9
2.3- Métodos analíticos para la determinación de imidacloprid en agua.	13
2.4- Espectroscopia fluorescencia asociada a calibración multivariada.	15
3- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.	21
3.1- Hipótesis.	21
3.2- Objetivo general.	21
3.3- Objetivos específicos.	21
4- MATERIALES Y MÉTODOS.	22
4.1- Reactivos y soluciones.	22
4.2- Aparatos y “software”.	22
4.3- Optimización del método.	24
4.3.1- Fluorescencia foto-inducida de imidacloprid.	24
4.3.1.1- Estudio del tiempo de exposición del imidacloprid a la radiación.	24
4.3.1.2- Estudio del tipo de celda a utilizar.	25
4.3.2- Optimización de la DLLME.	25
4.3.2.1- Diseño de Screening.	25
4.3.2.2- Diseño de optimización.	26

4.4- Preparación de muestra.	27
4.4.1- Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).	27
4.4.2- Fotoinducción del imidacloprid.	27
4.5- Muestras.	28
4.5.1- Set de muestras de calibración.	28
4.5.2- Set de muestras de validación sin interferentes en solvente.	29
4.5.3- Set de muestras de validación con interferentes en solvente.	29
4.5.4- Set de muestras de validación con interferentes sometido a extracción.	30
4.6- Muestras para el estudio de la precisión intra e inter día.	31
4.7- Estudio complementario sobre extracción en fase sólida con C18	31
4.8- Aplicación en muestras reales.	32
5- RESULTADOS Y DISCUSIONES.	33
5.1- Espectros de absorción, excitación-emisión de imidacloprid y de potenciales interferentes (clotianidina, tiametoxam y fipronil).	33
5.2- Optimización del método.	37
5.2.1- Fotoinducción de imidacloprid.	37
5.2.1.1- Estudio del tiempo de exposición de imidacloprid a la radiación.	37
5.2.1.2- Estudio del tipo de celda a utilizar.	38
5.2.2- Parámetros analíticos de la determinación de imidacloprid por fluorescencia fotoinducida.	41
5.2.3- Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).	44
5.2.3.1- Diseño de screening.	44
5.2.3.2- Diseño de Optimización.	45

5.3- Validación del método.	47
5.4- Precisión del método.	54
5.5- Aplicación en muestras reales.	55
5.6- Estudio complementario sobre extracción en fase sólida con C18.	57
5.6.1- Recuperación y precisión mediante SPE con C18.	57
5.6.2- Set de validación mediante extracción en fase sólida C18.	58
5.6.3- Aplicación en muestras reales mediante extracción en fase sólida con C18.	60
6- CONCLUSIONES.	62
7- BIBLIOGRAFIA.	64
ANEXO.	70

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Pesticidas neonicotinoides.	4
Figura 2. Cantidad de uso (Kg) anual de pesticidas neonicotinoides en agricultura y horticultura en el Reino Unido (UK).	6
Figura 3. Estructura química de imidacloprid y sus principales productos de descomposición.	8
Figura 4. Estructura química de fipronil.	11
Figura 5. Fotoinducción de imidacloprid en un capilar de vidrio de 0,1ml.	28
Figura 6. Espectros de absorción de (A) compuestos sin irradiar en AcN y (B) compuestos irradiados en buffer fosfato para imidacloprid (negro), clotianidina (rojo), thiamexom (azul) y fipronil (verde).	34
Figura 7. Estructuras de (a) imidacloprid y (b) 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(hidroxiimino)-3,4-didehidroimidazolideno.	35
Figura 8. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión de (A) imidacloprid, (B) clothinidin, (C) tiametoxam y (D) fipronil a una concentración de $1\mu\text{g ml}^{-1}$ en buffer fosfato pH 11,5 luego de 25 segundosde irradiación a 254nm.	36
Figura 9. Cinética de formación del fotoproducto fluorescente de imidacloprid a una concentración de $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$.	37

Figura 10. Diagrama pareto estandarizada de la influencia de cada factor en el porcentaje de recuperación de la extracción. 44

Figura 11. Resultado de la optimización de la extracción. (A) Superficie de respuesta estimada para la optimización de la extracción. (B) Contorno de superficie de la respuesta estimada, en donde (+) indica las condiciones optimas de la extracción considerando un porcentaje de cloruro de sodio de 10% (considera restricción de valor objetivo 100%). 46

Figura 12. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión de: (A) muestra de validación que contiene sólo imidacloprid a una concentración de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, (B) muestra de validación que contiene además clotianidina $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, tiametoxam $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y fipronil $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. 48

Figura 13. Gráficos de las concentraciones predichas para imidacloprid mediante U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-DAD. (A) para U-PLS con 1 RBL, (B) para U-PLS con 2 RBL y (C) para PARAFAC. Además se presentan las respectivas regiones elípticas de confianza (95% de confianza), donde (+) en la elipse indica el punto teórico (1,0) de pendiente e intercepto. 52

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de imidacloprid.	7
Tabla 2. Valores máximos, mínimos y centros de los factores del diseño de screening.	25
Tabla 3. Matriz de experimentos diseño Doehlert a tres factores. Se indica en () el valor codificado para cada factor.	26
Tabla 4. Concentraciones de imidacloprid en el set de validación en solvente.	29
Tabla 5. Concentraciones en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de imidacloprid, clotianidina, tiametoxam y fipronil del set de validación con interferentes.	30
Tabla 6. Cifras de mérito de las curvas de calibrado obtenidas para las tres celdas usadas.	39
Tabla 7. Precisión de las medidas para las celdas de 0,1; 0,4 y 1 ml.	40
Tabla 8. Cifras de mérito de la determinación de imidacloprid mediante espectroscopía de fluorescencia fotoinducida asociada calibración univariada y multivariada.	42
Tabla 9. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en los sets de validación en solvente (buffer).	47

Tabla 10. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción.	49
Tabla 11. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción respecto de HPLC.	51
Tabla 12. Precisión intra-día (n=3) e inter-día (n=6) para la recuperación de imidacloprid a diferentes concentraciones al aplicar DLLME-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.	54
Tabla 13. Recuperación de imidacloprid desde muestras de agua de diferente origen al aplicar DLLME-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.	55
Tabla 14. Precisión inter-día e intra-día para la recuperación de imidacloprid a una concentración de 10ng ml^{-1} mediante DLLME y SPE C18.	58
Tabla 15. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción mediante SPE C18 y DLLME.	59
Tabla 16. Recuperación de imidacloprid desde muestras de agua de diferente origen al aplicar SPE C18-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.	60

ABREVIATURAS.

λ_{ex}	Longitud de onda de excitación.
λ_{em}	Longitud de onda de emisión.
γ^{-1}	Inverso de la sensibilidad analítica.
b	Pendiente.
CCD	Colony collapse disorder
CE	Comisión europea.
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva.
EFSA	Autoridad europea de seguridad alimentaria.
EJCR	Región elíptica de confianza conjunta.
EPA	Agencia de protección ambiental.
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos.
K_d	Coeficiente de distribución.
K_{oc}	Coeficiente de adsorción normalizada a carbono orgánico.
K_{ow}	Coeficiente de partición octanol-agua.
LOD	Límite de detección.
LOQ	Límite de cuantificación.
MEE (EEM)	Matrices de excitación emisión (excitation emission matrix).
PARAFAC	Análisis de factores paralelos (parallel factor analysis).

PIF	Fluorescencia inducida fotoquímicamente (photochemically induced fluorescence)
PLS	Mínimos cuadrados parciales (partial least square).
r	Coeficiente de correlación.
REP	Error relativo de predicción.
RMSEP	Raíz del error cuadrado medio de predicción.
RSD	Desviación estándar relativa.
SAG	Servicio agrícola y ganadero
Sb	Desviación estándar de la pendiente.
SD	Desviación estándar.
SEN	Sensibilidad analítica.
SPE	Extracción en fase sólida (solid phase extraction).
Sx/y	Desviación estándar de la regresión.
U-PLS	Mínimos cuadrados parciales desdoblados (unfolded partial least square).
U-PLS/RBL	Mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a bilinealización residual (unfolded partial least square coupled to residual bilinearization).

RESUMEN.

Imidacloprid pertenece a un nuevo tipo de pesticidas llamados neonicotinoides. Estos son pesticidas sistémicos que se distribuyen dentro de las plantas después de ser absorbidos por ellas. Se les utiliza mediante rociado y en recubrimiento de semillas, principalmente para el control de plagas en cultivos como cereales, soja, maíz y muchas frutas y verduras. Desde la introducción de imidacloprid en 1991, el uso de diferentes pesticidas neonicotinoides ha crecido considerablemente, en Chile este pesticida se encuentra entre los 10 más vendidos de acuerdo a reportes del SAG.

Debido a su baja lipoficidad y reducida presión de vapor, el imidacloprid es un potencial contaminante de aguas naturales superficiales o subterráneas, ya sea por escorrentía o percolación. Este hecho evidencia la necesidad de establecer la situación ambiental correspondiente mediante el análisis periódico de aguas, lo que a su vez requiere disponer de métodos de análisis adecuados en términos de sensibilidad y selectividad.

En esta investigación se desarrolló un método para determinar imidacloprid en aguas, basado en extracción líquido-líquido micro dispersiva (DLLME) y fluorescencia foto-inducida asociada a calibración multivariada. Dado que la eficiencia de la extracción tiene una dependencia multifactorial, ésta fue optimizada mediante superficie de respuesta obteniéndose una recuperación promedio de 61 % (aceptable para las concentraciones del analito evaluadas entre 4 a 14 ng ml⁻¹), utilizando cloroformo-acetonitrilo (extractante-dispersante) en presencia de NaCl y agitación en vortex. La generación de un compuesto fluorescente se logró por irradiación del analito con luz UV a 254 nm, en medio básico, en un sistema batch utilizando un capilar de vidrio. Los espectros de emisión y de excitación-emisión fueron obtenidos mediante espectroscopia de

fluorescencia en micro-cubetas de cuarzo en una región amplia de longitudes de onda. El método de cuantificación fue desarrollado utilizando calibración de segundo orden, aplicando mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a bilinearización residual (U-PLS/RBL) y análisis paralelo de factores (PARAFAC) a matrices de excitación-emisión. Estas herramientas fueron utilizadas para predecir la concentración del analito en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil). Se analizaron tres grupos de muestras de complejidad creciente, los primeros dos set de validación se realizaron en buffer, el primero sin interferentes y el segundo en presencia de potenciales interferentes, obteniéndose un error de predicción (REP) inferior a 10% y un límite de detección (LOD) igual o inferior a $0,007 \mu\text{g ml}^{-1}$. El tercer set de muestras se realizó en presencia de interferentes agregando la etapa de extracción, se compararon estos resultados con los obtenidos mediante el método de referencia HPLC-DAD. Se observó que al agregar la etapa de DLLME se sobre-exige el modelo predictivo de segundo orden debido posiblemente a la co-extracción de otros compuestos no modelados, obteniéndose un error de predicción (REP) de 16% al utilizar U-PLS/RBL y porcentajes de recuperación entre un 50-88%. Este problema se confirmó al analizar un set de muestras reales, en el cual el porcentaje de recuperación obtenido estuvo entre un 27-93%, presentando mayor dificultad las muestras con un alto contenido de materia orgánica o con elevada dureza.

Debido a los problemas presentados con DLLME se propuso evaluar un método alternativo de extracción de imidacloprid mediante extracción en fase sólida con columnas de C-18. Se compararon los resultados obtenidos mediante este método con los obtenidos mediante DLLME obteniéndose mejores resultados para la SPE C-18 en cuanto a precisión y recuperación. Posteriormente se analizó nuevamente un set de muestras reales, obteniéndose recuperaciones entre un 64-114%.

SUMMARY

Imidacloprid belongs to a new type of pesticides called neonicotinoids. These are systemic pesticides which spread within the plants after being absorbed by them. They are used by spraying and seed coating, mainly to control pests in crops such as corn, soybean and many fruits and vegetables. Since the introduction of imidacloprid in 1991, the use of different neonicotinoids pesticides has grown considerably, this pesticide in Chile is among the Top 10 in sales, according to reports from SAG.

Due to its low lipophilic and reduced vapor pressure, imidacloprid is a potential contaminant of surface natural waters or groundwater, either by runoff or percolation. This fact highlights the need to establish the appropriate environmental situation through regular analysis of water, which in turn requires the availability of appropriate methods in terms of sensitivity and selectivity.

In this research, a method was developed to determine imidacloprid in water, based on dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME) and photo-induced fluorescence associated with multivariate calibration. Given that the extraction efficiency has a multifactorial dependence, it was optimized through response surface obtaining an average recovery of 61% (acceptable for analyte concentrations evaluated between 4 and 14 ng ml⁻¹), using chloroform-acetonitrile (extractant-dispersant) in the presence of NaCl and vortexing. The generation of a fluorescent compound was achieved by irradiating the analyte with UV light at 254 nm, in a basic medium, in a batch system using a glass capillary. The emission spectra and MEE were obtained through fluorescence spectroscopy, using quartz micro-cuvettes in a wide wavelength region. The quantification method was developed using second-order calibration, applying unfolded partial least squares coupled to residual bilinearization (U-PLS/RBL) and parallel factor analysis (PARAFAC), associated with MEE. These algorithms

were used to predict the concentration of the analyte in the presence of potential interferents (fipronil and others neonicotinoids pesticides).

Under these conditions, three groups of samples of increasing complexity were analyzed; the first two validation sets were performed in buffer, the first one without interferents and the second in presence of potential interferents, obtaining a error of prediction (REP) under 10% and a limit of detection (LOD) equal or lower than $0.007 \mu\text{g ml}^{-1}$. The third set of samples was performed in the presence of interferents, including the extraction stage; these results were compared with those obtained by the reference method HPLC-DAD. It was noted that adding the step of DLLME over-demands the model, possibly due to the co-extraction of other not modeled compounds, yielding 16% as error of prediction (REP) when using U-PLS/ RBL and recovery rates between 50-88 %. This problem was confirmed by analyzing a set of real samples, in which the recovery rate obtained was between 27-93%, being the most difficult samples those with high organic content or high hardness.

Due to problems presented with DLLME, it was proposed to conduct an alternative imidacloprid extraction method through solid phase extraction (SPE) using C18 columns. The results obtained by this method were compared with those obtained by DLLME, yielding better results for the C18 SPE for precision and recovery. Subsequently, a set of real samples were analyzed once again, obtaining recoveries between 64-114%.

1- INTRODUCCION.

Los pesticidas neonicotinoides son un grupo de compuestos altamente sistémicos, se distribuyen dentro de las plantas después de ser absorbidos por las hojas o raíces. Se utilizan principalmente mediante rociado y en recubrimiento de semillas, especialmente en el control de plagas en cultivos como cereales, legumbres, papas, soja, maíz y muchas frutas y verduras.

Debido a que tienen un alto espectro de eficacia, buena selectividad contra un elevado número de plagas e insectos, baja toxicidad en mamíferos, además de una gran versatilidad en una amplia gama de prácticas agrícolas, se han convertido en los plaguicidas más utilizados en este último tiempo.

Desde la introducción de imidacloprid en 1991, el uso de diferentes pesticidas neonicotinoides ha crecido considerablemente. En Chile este pesticida se encuentra entre los 10 más vendidos de acuerdo a reportes del SAG (Informe de uso de plaguicidas agrícola en Chile, 2008).

Los neonicotinoides pueden ser liberados al medio ambiente por pulverización sobre los campos de cultivo. Estos compuestos tienen una alta solubilidad en agua, por lo que pueden producir contaminación de las aguas superficiales o subterráneas vía escorrentía o percolación, además a través del drenaje de los suelos tratados (Sánchez-Bayo y col, 2014). El imidacloprid se puede degradar rápidamente en una serie de compuestos en aguas superficiales, por acción de la luz solar, pH, temperatura, etc. Estos compuestos pueden ser riesgosos para la salud de vertebrados, mamíferos y humanos (Ding y col, 2011; Ding y Lavine, 2011). Al ser transportado a aguas subterráneas, el imidacloprid se hace más persistente pudiendo afectar una serie de organismos acuáticos (Tisler y col, 2009, Hayasaka y col, 2012).

Esta problemática pone en evidencia la necesidad de establecer la situación ambiental correspondiente mediante el análisis periódico de aguas, lo que a su vez requiere disponer de métodos de análisis adecuados en términos de sensibilidad y selectividad.

En la actualidad se utilizan una serie de métodos analíticos para determinar y cuantificar pesticidas, dependiendo de las matrices ambientales y los límites de detección (LOD) que se quieran lograr. La mayoría de estas metodologías requieren largos tiempos de preparación y análisis de muestra, lo que puede ser una dificultad cuando existe un alto número de muestras que analizar. Esto sumado al alto costo y considerable consumo de solventes de elevada pureza de los métodos cromatográficos clásicos hacen necesario encontrar nuevas metodologías que permitan determinar un alto número de muestras de forma rápida, a bajo costo y de fácil implementación.

Dentro de las nuevas metodologías de preparación de muestras se encuentra la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), la cual permite la extracción y concentración de los analitos simultáneamente. Una gran desventaja de esta técnica es que es poco selectiva en matrices complejas, por lo que se utiliza principalmente en matrices simples. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible determinar pesticidas en matrices complejas como frutas o suelos mediante DLLME (Qiao y col, 2012; Wu y col, 2011; Zhang y col, 2012). Con respecto al análisis instrumental, una alternativa a los métodos cromatográficos es la espectroscopia de fluorescencia, que es un método rápido y económico. Sin embargo, al igual que en el caso anterior este método es poco selectivo, especialmente cuando es necesario cuantificar compuestos químicamente similares. Actualmente, una forma de mejorar la selectividad de estos métodos es el manejo de sus datos cualitativos y cuantitativos mediante procedimientos de análisis multivariado, como la calibración multivariada.

El presente trabajo de tesis busca desarrollar un método analítico que incluya una adecuada preparación de muestra basada en DLLME, junto a espectroscopia de fluorescencia asociado a análisis multivariado de datos, para la determinación de imidacloprid en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil) en muestras de agua.

2- MARCO TEORICO.

2.1- Pesticidas neonicotinoides.

Los neonicotinoides forman una familia de pesticidas sintéticos, los cuales se pueden clasificar en dos grupos, los pesticidas de primera generación (imidacloprid, tiacloprid, acetamiprid y dinotefurano) y los pesticidas de segunda generación, que se producen al cambiar la fracción cloropiridina por un grupo clorotiazol (clothianidina y tiametoxam) (Krieger, 2001). En la figura 1 se presenta la estructura química de estos compuestos.

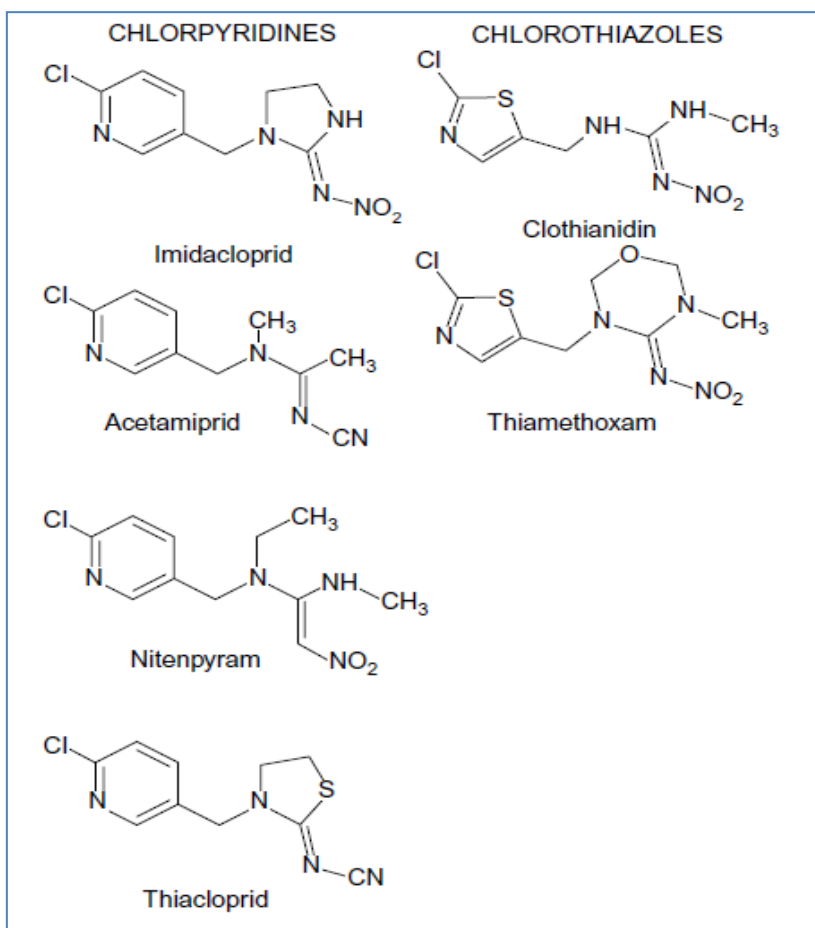


Figura 1. Pesticidas neonicotinoides.

El término “neonicotinoide” se utiliza para distinguir este producto de los nicotinoides, ya que los neonicotinoides son mucho más eficaces contra los insectos y menos tóxicos para las especies vertebradas (Krieger, 2001). Los neonicotinoides actúan a nivel del sistema nervioso central de los insectos, se unen a los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) provocando parálisis y muerte (Goulson, 2013). Estos pesticidas son solubles en agua, por lo que son fácilmente absorbidos por las raíces o las hojas y se transportan a través de los tejidos de las plantas, otorgando una gran ventaja en el control de plagas, especialmente en insectos perforadores o en aquellos que se alimentan de raíces.

Debido a que tienen un alto espectro de eficacia, buenas propiedades sistémicas, alta selectividad contra un elevado número de plagas e insectos, baja toxicidad en mamíferos, además de una gran versatilidad en una amplia gama de prácticas agrícolas; los pesticidas neonicotinoides se han convertido en los plaguicidas más utilizados en este último tiempo. A nivel mundial, el 60% de estos pesticidas se utilizan como recubrimiento de semillas en cultivos de girasol, papas, remolacha, etc. El 40% restante tiene diversos usos, ya que se puede utilizar en forma de pulverización para frutas blandas o soja, se puede inyectar en la madera contra las termitas o en árboles para protegerlos de los insectos herbívoros. También se puede utilizar en el hogar contra cucarachas y hormigas o como tópico en animales domésticos para eliminar parásitos externos (Goulson, 2013).

Un ejemplo del importante crecimiento en el uso de los pesticidas neonicotinoides se puede ver reflejado en la figura 2, donde se observan las cifras de utilización de los pesticidas en el Reino Unido (UK). Que van desde 3 toneladas en 1994 a casi 80 toneladas en el año 2011 (Defra 2012).

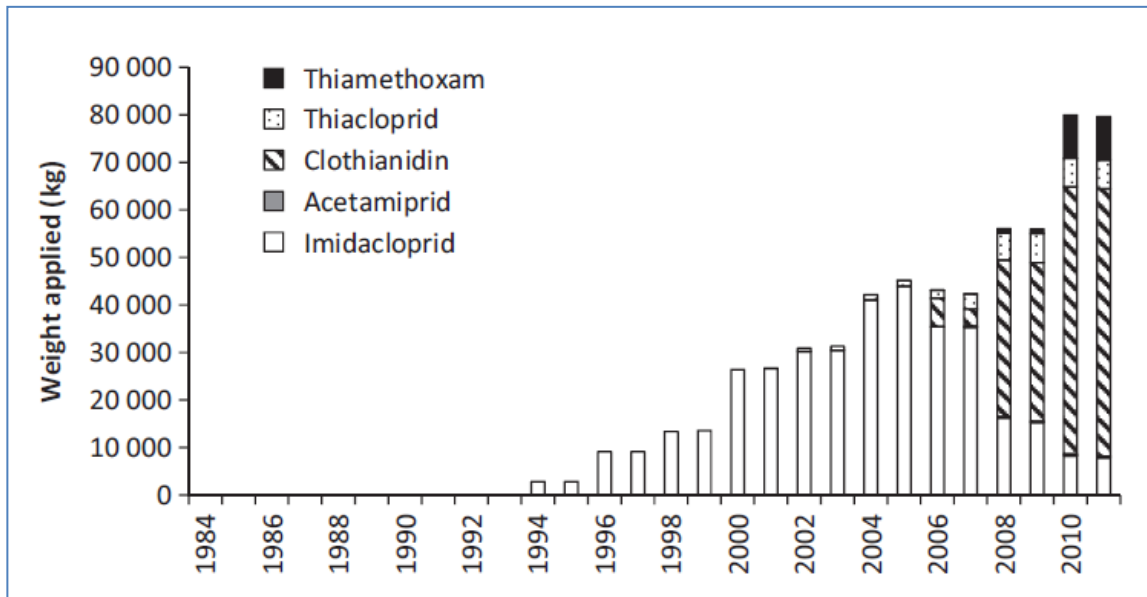


Figura 2. Cantidad de uso (Kg) anual de pesticidas neonicotinoides en agricultura y horticultura en el Reino Unido (UK).

El imidacloprid [1-[(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamina] es el primero de esta serie de compuestos que fue comercializado, hasta el día de hoy continúa siendo el neonicotinoide más utilizado en la industria agraria. Es un compuesto que en apariencia es de cristales incoloros, poco volátil y con un peso molecular de 255,7 g/mol (NPIC). En la tabla 1 se presentan las propiedades físicas y químicas de este compuesto.

Imidacloprid	
Peso molecular	255,7 g/mol
Solubilidad en agua	0,61g/L (20°C a pH 7)
Presión de vapor	3.00×10^{-12} mmHg (20°C)
Vida media de hidrólisis	> 30 días (25°C a pH 7)
Vida media de fotólisis acuosa	<1 hora (24°C a pH 7)
Vida media Anaeróbica	27,1 días
Vida media Aeróbica	997 días
Vida media de fotólisis en suelo	38,9 días
Constante de Henry	$1,7 \times 10^{-10}$ Pa m ³ /mol (20°C)
Kow	3,7
Kd	0,956- 4,18
Koc	132 -310

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de imidacloprid (Environmental Fate of Imidacloprid).

El imidacloprid es un pesticida de uso general, clasificado por la EPA como un agente de toxicidad clase II/III. Tiene evidencia de baja toxicidad por vía dérmica o inhalación, toxicidad moderada por vía oral, no es irritante y no hay evidencia de sensibilización dérmica en mamíferos. No es mutagénico o carcinogénico, no es tetarogénico y no tiene ningún efecto sobre la reproducción o el desarrollo. Al comparar los resultados de toxicidad de imidacloprid con otros pesticidas nenicotinoides se concluyó que los resultados son muy similares.

La mayoría de los pesticidas neonicotinoides se pulverizan sobre los campos de cultivo, liberándose directamente en el medio ambiente, lo que puede producir contaminación de las aguas superficiales o subterráneas vía escorrentía o percolación, además a través del drenaje de los suelos tratados. En aguas superficiales el imidacloprid se puede degradar rápidamente en una serie de compuestos (figura 3) debido a la luz solar, pH, temperatura, etc. que pueden ser riesgosos para la salud de vertebrados, mamíferos y humanos (Ding

y col, 2011; Ding y Lavine, 2011). Sin embargo, al ser transportado a aguas subterráneas este compuesto se hace más persistente, pudiendo afectar una serie de organismos acuáticos (Tisler y col, 2009, Hayasaka y col, 2012). En el estado de Nueva York se han detectado concentraciones que van desde 0,1-1,0 ppb en aguas subterráneas (Chemical Watch Factsheet).

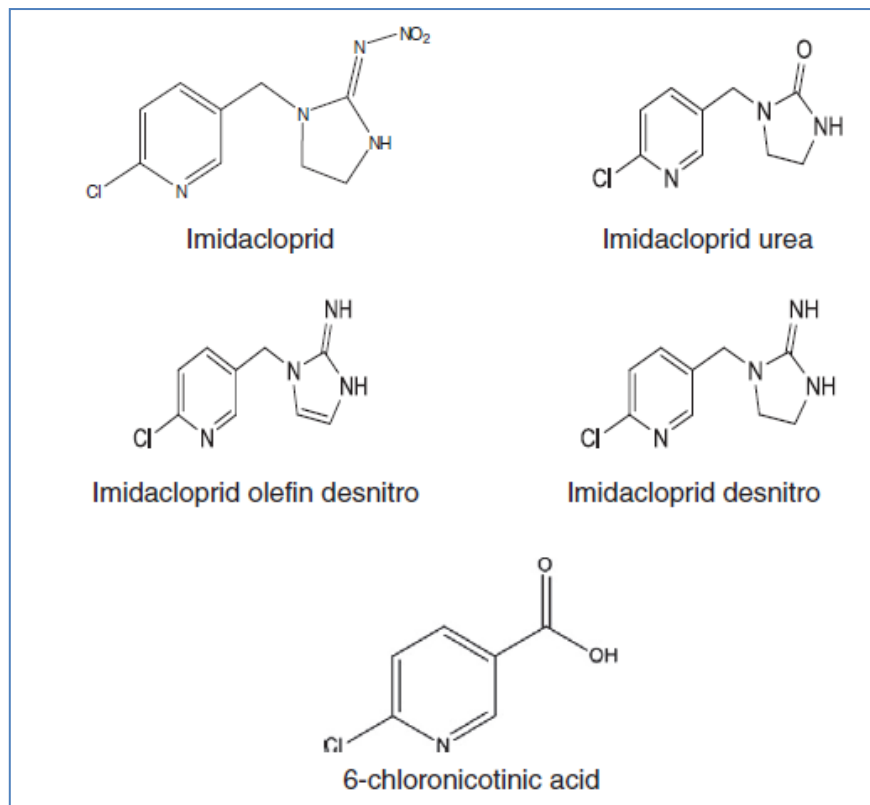


Figura 3. Estructura química de imidacloprid y sus principales productos de descomposición.

Todo lo expuesto anteriormente, es decir, el amplio crecimiento del uso de estos pesticidas, la persistencia y la alta toxicidad que tienen estos compuestos para una serie de organismos acuáticos hace patente un problema medio ambiental que debe ser revisado.

2.2- Historia y regulación de los pesticidas neonicotinoides.

La historia de los pesticidas neonicotinoides comienza a finales de los años 70' cuando la compañía química Shell investiga a los compuestos nitrometilenos heterocíclicos como potenciales pesticidas. Sin embargo, el imidacloprid fue descubierto en el año 1984 por la compañía agroquímica Bayer, la cual estaba investigando introducir un grupo 3-piridilmetil en la estructura heterocíclica del nitrometileno para aumentar la actividad del pesticida y reducir la toxicidad en mamíferos. Desde este descubrimiento se han desarrollado otros pesticidas neonicotinoides como el acetamiprid, tiacloprid y dinotefurano. Posteriormente se desarrollaron estudios para reemplazar la cloropiridina por un grupo clorotiazol para aumentar la capacidad insecticida de los compuestos, dando como resultado la segunda generación de pesticidas neonicotinoides entre los cuales están el clotianidina y el tiametoxam (Krieger, 2001).

Desde su lanzamiento en 1991, el imidacloprid es el neonicotinoide más utilizado en la industria agraria, se comercializa en alrededor de 120 países para ser utilizado en más de 140 cultivos agrícolas. Es uno de los productos más vendidos de Bayer CropScience, siendo comercializado con diferentes nombres, como: Admire, Advantage, Confidor, Gaucho, Genesis, Impower, Intercept, Maxforce IC, y Merit (Canadian Water Quality Guidelines).

Debido al amplio uso que tienen estos pesticidas neonicotinoides, especialmente el imidacloprid, es necesario revisar el riesgo medio ambiental que pueden producir. Como consecuencia de su alta solubilidad en agua y persistencia en los suelos, es un potencial contaminante de aguas, principalmente por escorrentía luego de tormentas y por lixiviación a las aguas subterráneas (Sánchez-Bayo y col, 2014). Los científicos Starner y Goh (2012) realizaron un estudio en California (USA) confirmando esta situación, se encontró imidacloprid en el 85-100% de estudios realizados en aguas

superficiales, entre los cuales algunas muestras presentaron concentraciones superiores a las concentraciones de referencia de la EPA ($1,05\mu\text{g/L}$) para la protección de la vida acuática. Estos estudios representan un problema para la calidad de agua, ya sea para el abastecimiento de consumo humano o animal.

El imidacloprid es tóxico para algunas especies acuáticas a bajas concentraciones, siendo más susceptibles los peces jóvenes que los adultos. Tisler y col (2009) han reportado que los productos comerciales de imidacloprid, como Cofindor SL 50, son altamente tóxicos para algunos cuerpos acuáticos, como bacterias, dafnias y peces cebras.

Estos estudios han puesto en alerta a algunos países como EE. UU, Canadá, los Países Bajos y Suecia, estableciendo un reglamento donde se regula la concentración máxima de imidacloprid y de otros pesticidas neonicotinoides ($0,13-1,05\mu\text{g/L}$) con la finalidad de proteger el ecosistema acuático (Sánchez-Bayo y col, 2014). Se han presentado estudios que indican que los neonicotinoides muestran toxicidad acumulativa en el tiempo, por muy bajas que sean las concentraciones detectadas en cuerpos de agua, como ríos o lagos, es fundamental realizar mediciones periódicas de estos compuestos para asegurar la protección del ecosistema acuático.

Además de la problemática mencionada anteriormente, los pesticidas neonicotinoides tendrían un efecto adverso sobre la población de las abejas, siendo uno de los posibles factores responsables del denominado “colony collapse disorder” (CCD) (Blacquièrre y col, 2012; Farooqui 2013). Este síndrome se caracteriza por el despoblamiento rápido y repentino de las colmenas por parte de las abejas obreras, lo que lleva a su muerte, la de las larvas y reina que quedan sin cuidado. Junto con la disminución de la producción de miel, el efecto más negativo es la pérdida de insectos polinizadores y las consecuencias negativas que esto tiene sobre la reproducción de múltiples cultivos (frutales principalmente).

En este sentido, diversos estudios indican que estos pesticidas tienen efectos letales sobre la población de las abejas (Goulson, 2013; Ratnieks y Carreck, 2010; Tapparo y col, 2012), por lo que en enero de 2013 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó tres dictámenes científicos sobre los riesgos planteados por estos pesticidas. A raíz de lo cual la Unión Europea (UE) decidió prohibir parcialmente, a partir del 24 de mayo de 2013, el uso de imidacloprid, clotianidina y tiametoxam en el tratamiento de semillas y suelos, o como aplicación foliar de los siguientes cultivos: maíz, colza, soja, cebada, mijo, avena, arroz, centeno, sorjo y trigo. Posteriormente, el 1 de diciembre de 2013, se prohibió también la comercialización de semillas tratadas con estos tres neonicotinoides (Reglamento de ejecución (UE) N° 485/2013).

Otro compuesto que se presume que puede tener una alta influencia en el CCD es el acaricida fipronil (figura 4), el cual ha sido clasificado por la EPA como clase C (posiblemente carcinogénico en humanos).

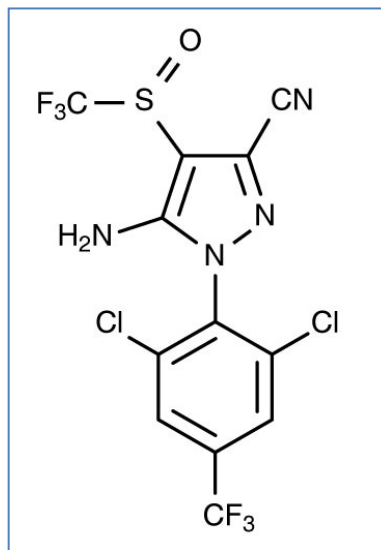


Figura 4. Estructura química de fipronil.

Este acaricida ha ganado popularidad a través del mundo debido a que al igual que los neonicotinoides es un plaguicida sistémico, y puede ser utilizado para el control en una amplia gama de plagas (Grupta, 2007). Sin embargo, este compuesto es bioacumulable y no se degrada naturalmente, por lo que puede permanecer un largo período en el ambiente y acumularse en tejidos de humanos y animales. Es un compuesto altamente tóxico para algunas aves, peces e invertebrados acuáticos, sin embargo el fipronil es poco soluble en agua, y tiende a unirse a los sedimentos, disminuyendo potencialmente el riesgo para el ecosistema acuático.

2.3- Métodos analíticos para la determinación de imidacloprid en agua.

En la actualidad se utilizan una serie de métodos analíticos para detectar y cuantificar imidacloprid, dependiendo de las matrices ambientales y los límites de detección que se quieren lograr. Como se mencionó anteriormente el imidacloprid es persistente, no biodegradable en sistemas acuáticos y tóxico a bajas concentraciones para una serie de organismos en este medio; por lo cual se hace fundamental desarrollar métodos analíticos que permitan determinar este compuesto de forma rápida y fácil en matrices acuosas.

La preparación de la muestra antes del análisis instrumental es el paso más importante en la mayoría de los procesos analíticos. Es fundamental desarrollar técnicas de preparación de muestra que permitan ahorrar tiempo, disminuir el consumo de solventes y facilitar el proceso analítico. El proceso de extracción de los pesticidas neonicotinoides desde muestras acuosas ha sido realizado de diversas formas, como por ejemplo por medio de extracción en fase sólida (SPE) (Baskaran y col, 1997; Ettiene y col, 2012; Starner y col, 2012; Tisler y col, 2009; Wu y col, 2011), extracción líquido-líquido (LLE) (Baskaran y col, 1997; Fernandez y col, 1996), además de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Qiao y col, 2010; Wu y col, 2011; Zhang y col, 2012) y este mismo método asistido con ultrasonido UDLLME (Qiao y col, 2010).

DLLME permite la extracción y concentración de los analitos simultáneamente. Se basa en un sistema ternario de solventes, que se constituye por una fase acuosa (contiene a los analitos que pretenden ser extraídos) y una mezcla de dos solventes orgánicos, uno miscible con el agua (agente dispersante) y uno inmisible con ésta (extractante). La mezcla extractante-dispersante se pone en contacto con la fase acuosa, se forma una emulsión de manera que se incrementa al máximo la superficie de contacto entre las fases para favorecer el traspaso del analito al solvente extractante.

Luego, se centrifuga y se obtiene una separación de las fases, quedando al fondo el agente extractante por tener una mayor densidad junto con los analitos extraídos (fase sedimentada). Una gran desventaja de esta técnica es que es poco selectiva, por lo que se utiliza principalmente en matrices simples, sin embargo últimamente se han realizado investigaciones de análisis de pesticidas en matrices más complejas, como en frutas o suelos (Qiao y col, 2012; Wu y col, 2011; Zhang y col, 2012).

Por otra parte, la determinación analítica de los pesticidas neonicotinoides se ha llevado a cabo principalmente a través de HPLC-DAD (Baskaran y col, 1997; Fernandez y col, 1996; Qiao y col, 2010; Sánchez-Bayo y col, 2014; Schippers y col, 2008; Starner y col, 2012; Tisler y col, 2009; Wamhoff y col, 1999; Wu y col, 2011; Zabar y col, 2012), HPLC/MS (Ding y col, 2011; Schippers y col, 2008), además de cromatografía de gases (GC) acoplado a espectrómetro de masa (MS) (Vilchez y col, 1996), cromatografía iónica (CI) (Subhani y col, 2013; Zabar y col, 2012) y cromatografía electrocinética micelar (MEKC) (Ettiene y col, 2012). También se han utilizado técnicas de foto-inducción de la fluorescencia de estos compuestos con luz UV (PIF) para desarrollar métodos de cuantificación basados en esta propiedad. Es así como se ha empleado PIF a la salida de la columna cromatográfica en HPLC (Gil y col, 2007; Subhani y col, 2013); en sistemas de inyección en flujo (FIA) (Vilchez y col, 1998-2001; Llorent-Martínez y col, 2011) o FIA con acumulación sobre silica-C18 (López y col, 2007)

La mayoría de las metodologías con cromatografía requieren largos tiempos de preparación y análisis de muestra, lo que puede ser una dificultad cuando existe un alto número de muestras que analizar. Esto sumado al alto costo y elevado consumo de solvente de los métodos cromatográficos clásicos hacen necesario encontrar nuevas metodologías que permitan determinar un alto número de muestras de forma rápida, de bajo costo y fácil implementación.

2.4- Espectroscopia fluorescencia asociada a calibración multivariada.

Una alternativa más rápida y económica que la cromatografía es la espectroscopia de fluorescencia. Como fue mencionado anteriormente, la irradiación con luz UV de algunos pesticidas neonicotinoides produce fotoproductos fluorescentes. Generalmente la cinética de la formación del fotoproducto es rápida y por irradiación directa de la muestra, por lo que este método es muy rápido y simple (Vilchez y col, 1998, 2001). Los métodos reportados realizan la medición de fluorescencia a una sola longitud de onda (Gil y col, 2007; Subhani y col, 2013; López y col, 2007) limitando su aplicación a muestras que contengan únicamente al analito de interés como compuesto fluorescente a esa longitud de onda.

La espectroscopia de fluorescencia tiene como ventaja su gran sensibilidad. Sin embargo, es poco selectiva en compuestos químicamente similares, situación que podría darse al ser utilizada para analizar muestras reales y/o con varios constituyentes. Por ello, su aplicación en estos casos requiere mejorar su selectividad. Esto se puede lograr al utilizar una mayor cantidad de la información espectral generada por la muestra y métodos quimiométricos para construir modelos de calibración multivariada con esta información.

La calibración multivariada permite utilizar la zona de mayor interés dentro de los datos obtenidos (espectros), facilitando de esta forma la obtención de la información de los analitos y no de las demás señales presentes, aumentando la selectividad del método y reduciendo el ruido. Ahora, dependiendo de la naturaleza de los datos que se dispongan se puede realizar una calibración de orden cero clásica, en la que se correlaciona un vector de concentración con un vector de respuesta (una vía: escalar v/s escalar). Una calibración de primer orden, en la que se correlaciona un vector de concentración con una matriz correspondiente a los espectros de emisión de

cada muestra (dos vías: escalar v/s vector), o una calibración de segundo orden, en la que se utiliza una matriz de fluorescencia de excitación-emisión (MEE) de múltiples muestras generando un arreglo de tres vías (escalar v/s matriz).

Una de las técnicas más utilizadas en la calibración de primer orden es la de mínimos cuadrados parciales (PLS), que se basa en un método de análisis de factores en el cual una matriz correspondiente al espectro de emisión de una muestra (X) se correlaciona con un vector de concentración (Y) transformándose en una estructura del tipo:

$$X = T \cdot P^T + E \quad (1)$$

donde, X es la matriz de calibración (espectros), P es la matriz de “loadings”, T de “scores” y E es la matriz de residuos. En forma simultánea a esta descomposición matricial, se establece una correlación entre el vector de concentración y la matriz de “scores”.

$$y_n = T \cdot v_n + e \quad (2)$$

donde, v_n es el vector de coeficientes de regresión que correlaciona la respuesta y_n de cada analito y e es la matriz de residuos. Los factores v_n y P describen la máxima correlación entre los datos espectrales y el vector de concentración. Este tipo de calibración requiere la construcción de un conjunto de calibración lo suficientemente representativo de las muestras donde sean modelados todos los componentes de la muestra, incluso aquellos interferentes desconocidos que pueden tener las muestras complejas. Lo anterior genera una gran desventaja, ya que las interferencias que no sean modeladas generarán una mala predicción de las concentraciones (Escandar y col, 2007).

En la calibración de segundo orden se puede predecir la concentración de los analitos en muestras donde puedan existir interferentes no modelados inicialmente en el calibrado (ventaja de segundo orden). Entre los algoritmos de segundo orden, los más utilizados son el análisis paralelo de factores (PARAFAC) y los mínimos cuadrados parciales desdoblados acoplados a bilinearización residual (U-PLS/RBL).

Para el análisis de datos de tres vías, PARAFAC es un algoritmo que tiene la capacidad de procesar múltiples muestras, es robusto y muy eficiente, por lo que si el modelo es una descripción de una estructura química, se pueden alcanzar resultados con una interpretación química. Este método de calibración de segundo orden descompone los componentes en tres vías, entregando una solución matemática única para un número dado de componentes, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ij} \quad (3)$$

donde, x_{ijk} representa los datos por muestra i en los canales instrumentales j y k , por ejemplo las longitudes de excitación y emisión, a_{in} representa la concentración relativa (scores), b_{jn} y c_{kn} representan los “loadings” para los canales instrumentales, y e_{ijk} es la suma de cuadrado de los residuos. El intervalo del modelo está dado por el número de factores o componentes (N) necesarios para describir la variación sistemática en el arreglo de datos, si el modelo es trilineal el número de factores debería ser el número de componentes que tienen señales medibles en la muestra (Escandar y col, 2014). Este valor es crucial en el desarrollo del modelo, por lo que existen varios criterios para su evaluación, entre los que se encuentran el porcentaje de ajuste y la consistencia de núcleo (Bro 2003). Lo ideal es obtener valores

cercanos a 100 para ambos parámetros, de forma que el modelo entregue una medida adecuada de la variabilidad de los datos experimentales.

Como se mencionó anteriormente, otro algoritmo de segundo orden ampliamente utilizado es U-PLS/RBL, este algoritmo opera en dos etapas (Olivieri 2005), primero las $X_{c,i}$ matrices de calibrado (de tamaño $J \times K$, donde J y K son el número de canales en cada modo de datos) son desdobladas, vectorizadas y agrupadas en una nueva matriz Z_x . Posteriormente esta matriz, junto con los vectores de concentración ($l \times 1$, donde l es el número de muestras de calibración), son usados aplicando el modelo PLS común para obtener los “loadings” contenidos en la matriz P y los “loadings” de peso contenidos en la matriz W (ambos de tamaño $JK \times A$, donde A es el número de factores) y coeficientes de regresión v ($A \times 1$). El parámetro A se selecciona comúnmente por validación cruzada (leave-one-out cross validation). Si la calibración fuera exacta, v puede ser empleado para estimar las concentraciones de los analitos en una muestra desconocida utilizando la ecuación (4).

$$y_u = t_u^T v \quad (4)$$

Donde, t_u es el “score” de la muestra problema, obtenido por proyección de sus datos (desdoblados) X_u en el espacio de los factores A como se indica en la ecuación (5)

$$t_u = (W^T P)^{-1} W^T \text{vec}(X_u) \quad (5)$$

Cuando es necesario obtener la “ventaja de segundo orden” al utilizar U-PLS debido a que la muestra presenta interferentes que no están modelados en el calibrado, se puede utilizar la bilinearización residual. Este es un procedimiento utilizado después de la calibración, que separa las señales que pueden ser explicadas por el modelo de calibrado de aquellas que podrían ser potenciales interferentes. La matriz de datos X_u de una muestra con

constituyentes inesperados, es vectorizada [$\text{vec}(X_u)$] y luego expresada como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{vec}(X_u) = Pt_u + [B_{unx} G_{unx} (C_{unx})^T] + e_{RBL} \quad (6)$$

donde, e_{RBL} es el error residual de RBL y B_{unx} , G_{unx} , y C_{unx} son obtenidos a partir del PCA (comúnmente realizado por descomposición de valores singulares, SVD) de una matriz residual obtenida luego de reformular el vector e_{RBL} calculado, asumiendo que las interferencias están ausentes como se indica en la ecuación (7):

$$B_{unx} G_{unx} (C_{unx})^T = SDV\{\text{reshape}[\text{vec}(X_u) - Pt_u]\} \quad (7)$$

donde, “reshape” indica la operación inversa a la vectorización, es decir convertir el vector $JK \times 1$ en la matriz $J \times K$, y la operación SVD es aplicada utilizando el primer componentes principal N_{unx} , donde N_{unx} es el número de componentes inesperados en la muestra.

El procedimiento de RBL consiste en mantener constante la matriz de “loadings” P en la ecuación (6) y variar t_u , con el objetivo de minimizar la norma de e_{RBL} ($|e_{RBL}|$). En la ecuación (6) la desviación estándar (s_{RBL}) de los residuos puede ser considerada como una medida de la bondad de ajuste (GOF) y está dada por la ecuación (8).

$$s_{RBL} = \|e_{RBL}\| / [(J - N_{unx})(K - N_{unx}) - A]^{1/2} \quad (8)$$

Normalmente el número de componentes inesperados se fija de acuerdo al s_{RBL} obtenido para un número creciente de N_{unx} , asumiendo que el valor de s_{RBL} se estabiliza en un valor comparable con el ruido instrumental cuando el valor correcto de N_{unx} ha sido encontrado.

Ahora bien, a pesar de las grandes ventajas que ofrecen estos algoritmos de segundo orden, es necesario mencionar que existen tres fuentes importantes de problemas en la calibración de segundo orden. En primer lugar, desviaciones de la trilinearidad ideal producida por efecto de filtros internos. En segundo lugar, por la superposición espectral de varias componentes de la muestra. Y en tercer lugar, debido a perfiles espectrales idénticos en todas las muestras producto de algún fenómeno físico, lo que puede ocurrir entre analitos calibrados o entre el analito y alguna interferencia. Estos factores pueden sobre-exigir el modelo logrando que algunos algoritmos no puedan predecir de forma adecuada los datos (Escandar y col, 2014).

Con los antecedentes antes mencionados, se plantea desarrollar un método analítico que permita determinar imidacloprid en muestras de agua, en presencia de potenciales interferentes, de manera rápida, fácil y a bajo costo; basada en DLLME junto con espectroscopia de fluorescencia foto-inducida, asociada a calibración multivariada de segundo orden.

3- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

3.1- Hipótesis.

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la fluorescencia inducida fotoquímicamente asociada a calibración multivariada, puede ser utilizada como un método rápido y fácil para determinar imidacloprid en muestras de agua en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil).

3.2- Objetivo general.

Desarrollar un método analítico para determinar imidacloprid en agua mediante microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y fluorescencia inducida fotoquímicamente asociado a calibración multivariada.

3.3- Objetivos específicos.

- Evaluar las condiciones experimentales que permitan lograr la máxima fluorescencia mediante fotoinducción de imidacloprid.
- Estudiar los espectros de emisión del imidacloprid y de potenciales interferentes (clotianidina, tiametoxam y fipronil) y de mezclas de los mismos, para luego evaluar la posibilidad de cuantificarlos mediante calibración multivariada en solución patrón.
- Estudiar los parámetros de extracción y preconcentración de los pesticidas mediante microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).
- Aplicar el método propuesto a muestras de agua de diferente origen (pozo, río, etc.).

4- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1- Reactivos y soluciones.

Se trabajó con estándares sólidos certificados de imidacloprid, clotianidina, tiametoxam y fipronil de marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Además se utilizó cloruro de sodio (NaCl), hidróxido de sodio (NaOH) y fosfato monoácido de sodio (NaHPO₄) de marca Merck (Darmstadt, Germany).

Se utilizó cloroformo marca Merck (Darmstadt, Germany) grado análisis orgánico de trazas y acetonitrilo marca Merck (Darmstadt, Germany) grado HPLC. Ambos solventes fueron usados como se recibieron.

Las soluciones “stock” de los pesticidas puros (1000 µg ml⁻¹) fueron preparadas en acetonitrilo. A partir de estas soluciones se prepararon soluciones más diluidas (100 µg ml⁻¹), las cuales fueron elaboradas tomando los volúmenes apropiados y diluyéndolas en acetonitrilo. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4°C en viales ámbar y protegidas de la luz. Las soluciones se mantienen estables por un período de dos meses aproximadamente.

Los estándares sólidos, así como las soluciones preparadas fueron manipuladas con la debida precaución, utilizando guantes y ropa de protección.

4.2- Aparatos y “software”.

Para llevar a cabo la extracción de imidacloprid desde las muestras líquidas se utilizó un agitador a vibración vortex ZX3 VELP Scientifica (Usmate, MB, Italy), además se ocupó un baño de ultrasonido Elma Transonic digital D-78224 (Singen, Germany) y una centrífuga Labofuge 400 marca Heraeus (Hanau, Germany). Para la preparación del buffer fosfato se utilizó un pH metro marca Oakton (Vernon Hills, USA) modelo pH1100.

La irradiación de las muestras se realizó con una lámpara UV sin filtro VL-115.G de 15 watt de potencia, a una longitud de onda de 254nm, en capilares de vidrio de 100µl Blaubrand Intramark (Wertheim, Germany).

Las medidas de fluorescencia clásica y total fueron realizadas en un espectrómetro de fluorescencia Varian Cary-Eclipse (Mulgrave, Australia) equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de destello de xenón; conectado a un computador mediante una interface serial IEEE 488 (GPIB). Los espectros de fluorescencia clásica fueron registrados a una λ_{ex} : 355 nm y λ_{em} : 365 nm a 700 nm cada 2 nm a una velocidad de barrido de 600 nm min⁻¹ utilizando un promedio de tres barridos. Para la fluorescencia total los espectros de excitación-emisión (MEE) fueron registrados en los intervalos: λ_{ex} : 220-400 nm cada 5 nm y λ_{em} : 324-550 nm cada 2 nm, a una velocidad de barrido de 600 nm min⁻¹. Los "slit" de excitación y emisión se fijaron en 10nm.

Se trabajó con tres tipos de celda de cuarzo de diferentes volúmenes (100, 400 y 1000µl) de 1,0 cm de paso óptico. Los espectros fueron guardados en formato ASCII para su uso posterior.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) se realizaron en un cromatógrafo líquido marca Waters (Milford, MA, USA) equipado con una bomba cuaternaria Waters 600, un detector de arreglo de diodos Waters 996 y un "autosampler" Waters 717 Plus. El sistema de control, la adquisición y procesado de los datos se llevó a cabo con el "software" Empower. Para la separación cromatográfica de los pesticidas se utilizó una columna Eclipse XDB C18 (150 x 4,6 mm diámetro interno, 5 µm tamaño de partícula) marca Agilent (Santa Clara, USA). La fase móvil usada consistió en una mezcla de acetonitrilo (A) y agua acidificada con ácido fosfórico hasta obtener un pH=2,65. El flujo de la fase móvil fue de 1,2 mL min⁻¹. El programa de elución optimizado consistió en realizar un gradiente lineal de 30 a 75% A en 1 minuto, seguido por 4 min a 75% A isocrático, y de

regreso a las condiciones iniciales: en 1 min gradiente lineal de 75 a 30% A; seguido finalmente por 6 min de 30% A isocrático. Se utilizó un volumen de inyección de 20 μL , y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 35 $^{\circ}\text{C}$ para obtener tiempos de retención reproducibles. La identificación de los cuatro pesticidas se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_r en minutos) con los obtenidos para los estándares en las mismas condiciones.

Las rutinas para el pre-tratamiento (eliminación de Rayleigh en las matrices de excitación-emisión) (Zepp y col. 2004) y el procesado de datos se realizó mediante MATLAB (The MathWorks Inc 2000), Statgraphics (Statgrafics Centurion XV) y Origin Lab (Origin Lab Corporation 1991-2008). Las rutinas empleadas para PLS, PARAFAC y U-PLS/RBL se encuentran disponibles en internet (<http://www.models.kvl.dk/algorithms>). Los algoritmos fueron implementados utilizando la interface grafica MVC1 y MVC2, también disponible en internet (<http://www.chemometry.com>).

4.3- Optimización del método.

4.3.1- Fluorescencia foto-inducida de imidacloprid.

4.3.1.1- Estudio del tiempo de exposición del imidacloprid a la radiación.

Se estudió el tiempo de irradiación necesario para lograr una fluorescencia máxima del imidacloprid, esto se realizó llevando una solución de $0,5\mu\text{g ml}^{-1}$ en buffer fosfato 0,01M a pH 11,5 (López y col, 2007) a un capilar de vidrio de $100\mu\text{l}$ y sometiéndolo a irradiación con una lámpara UV de 254nm. Los tiempos de irradiación fueron desde 5 a 50 segundos en intervalos de 5 segundos.

4.3.1.2- Estudio del tipo de celda a utilizar.

Se realizó un estudio del tipo de celda a utilizar para obtener el espectro de fluorescencia, para esto, la solución irradiada se llevó a una celda de 100 μ l, o se diluyó para llevarlo a celdas de mayor capacidad (400 o 1000 μ l).

4.3.2- Optimización de la DLLME.

4.3.2.1- Diseño de Screening.

Se trabajó con un diseño factorial fraccionado $2^{(5-1)}$ para determinar qué factores influyen en la eficiencia de extracción. Se realizaron 16 experimentos más 4 centros, en los cuales los factores estudiados fueron el volumen de cloroformo (CHCl_3) y acetonitrilo (AcN), el porcentaje de cloruro de sodio (%NaCl), el tiempo y la temperatura de ultrasonido (US). En la tabla 2 se presentan los valores máximos (1), mínimos (-1) y los centros (0) de los factores estudiados para el diseño de screening.

Tabla 2. Valores máximos, mínimos y centros de los factores del diseño de screening.

Factores	-1	1	0
A= Vol CHCl_3	0,1 ml	0,3 ml	0,2 ml
B= Vol AcN	0	2 ml	1 ml
C= NaCl	0	10% p/v	5 % p/v
D= Tiempo US	0	5 min	2,5 min
E= Temp US	20°C	35°C	27 °C

4.3.2.2- Diseño de optimización.

Luego de determinar los factores que influyen en la extracción de los pesticidas se realizó una optimización con un diseño Doehlert para tres factores. Los factores estudiados son el porcentaje de cloruro de sodio a 3 niveles, el volumen de acetonitrilo a 5 niveles y el volumen de cloroformo a 7 niveles. En la tabla 3 se presentan los valores máximos reales y codificados de los tres factores estudiados.

Tabla 3. Matriz de experimentos diseño Doehlert a tres factores.

Se indica en () el valor codificado para cada factor.

Muestra	AcN (ml)	CHCl ₃ (ml)	NaCl (%p/v)
1	2 (0)	0,25 (0)	10 (0)
2	2 (0)	0,25 (0)	10 (0)
3	2 (0)	0,25 (0)	10 (0)
4	3 (1)	0,25 (0)	10 (0)
5	2,5 (0,5)	0,4 (0,866)	10 (0)
6	1,5 (-0,5)	0,4 (0,866)	10 (0)
7	1 (-1)	0,25 (0)	10 (0)
8	1,5 (-0,5)	0,1 (-0,866)	10 (0)
9	2,5 (0,5)	0,1 (-0,866)	10 (0)
10	1,5 (-0,5)	0,2 (-0,289)	8 (-0,816)
11	2 (0)	0,35 (0,577)	8 (-0,816)
12	2,5 (0,5)	0,2 (-0,289)	8 (-0,816)
13	1,5 (-0,5)	0,3 (0,289)	12 (0,816)
14	2 (0)	0,15 (-0,577)	12 (0,816)
15	2,5 (0,5)	0,3 (0,289)	12 (0,816)

4.4- Preparación de muestra.

4.4.1- Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).

Para la microextracción L-L dispersiva se pesó en un tubo cónico de 15ml una masa de $1,00 \pm 0,01$ g de cloruro de sodio al cual se le adicionó 10ml de muestra. A esto se le agregó 0,3 ml de cloroformo como solvente de extracción y 2ml de acetonitrilo (solvente de dispersión). La muestra fue agitada vigorosamente por 1 minuto en un agitador vortex y luego sonicada por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la solución fue centrifugada a 3500rpm por 4 minutos. La fase orgánica sedimentada fue transferida a un tubo cónico de 1,5ml y evaporada a sequedad con una corriente de nitrógeno sobre un bloque calefaccionado a 40° C, luego se reconstituyó en 0,2ml de buffer fosfato 0,01M a pH 11,5; se sonicó por 1 minuto y se irradió para fotoinducir la fluorescencia del compuesto.

4.4.2- Fotoinducción del imidacloprid.

Para generar un compuesto fluorescente a partir del imidacloprid, se aspiraron 100 μ l de la muestra en una micropipeta tipo capilar desechable de vidrio (Brand) de igual capacidad, se selló con cera de sellado para hematocrito (Brand) por un lado y con parafilm por el lado opuesto, luego se expuso a la lámpara UV de 254nm por 25 segundos (figura 5), se quitó el parafilm y se cortó la punta del capilar por el lado de la cera con un cortador de columnas de sílice, traspasando la muestra directamente en una celda de cuarzo de 100 μ l para obtener los espectros de fluorescencia.

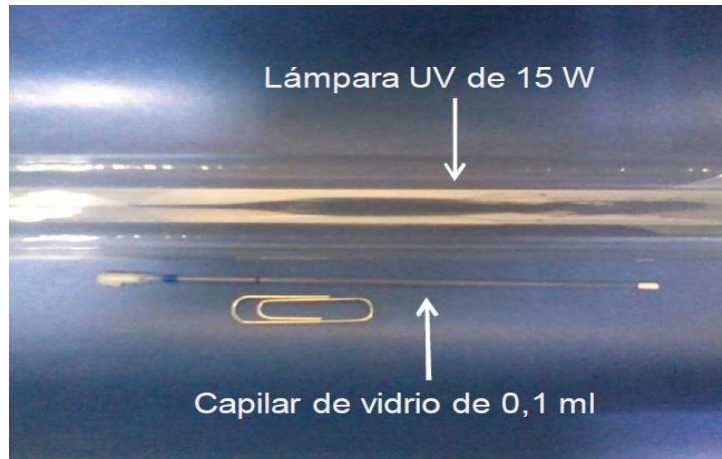


Figura 5. Fotoinducción de imidacloprid en un capilar de vidrio de 0,1ml.

4.5- Muestras.

4.5.1- Set de muestras de calibración.

Se trabajó con un set de 8 muestras de calibración a concentraciones 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0 y 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de imidacloprid en duplicado más un blanco. Esto se realizó preparando las soluciones en buffer fosfato e irradiándolas por 25 segundos para posteriormente obtener los espectros de fluorescencia. Se obtuvieron datos de una vía (un valor de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda por muestra), dos vías (un espectro de fluorescencia por muestra) y tres vías (un espectro de excitación-emisión por muestra), los que posteriormente se emplearon para construir los modelos de calibrado respectivos.

4.5.2- Set de muestras de validación sin interferentes en solvente.

Se preparó un set de validación de imidacloprid en solvente a diferentes concentraciones de aquellas del set de calibrado (tabla 4), esto se realizó preparando las muestras en buffer fosfato e irradiándolas por 25 segundos y obteniendo posteriormente los espectros de excitación-emisión. Los datos generados fueron empleados para predecir las concentraciones del pesticida usando un calibrado de segundo orden.

Tabla 4. Concentraciones de imidacloprid en el set de validación en solvente.

Muestra	Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$
1	0,72
2	0,22
3	0,44
4	0,38
5	0,64
6	0,5
7	0,29
8	0,68
9	0,20
10	0,58

4.5.3- Set de muestras de validación con interferentes en solvente.

Con el objetivo de evaluar la capacidad predictiva del modelo en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil), se preparó un set de validación de 10 muestras a diferentes concentraciones en solvente (tabla 5) en presencia de dichos compuestos. Esto se realizó preparando las muestras en buffer fosfato e irradiándolas por 25 segundos, obteniendo posteriormente los espectros de excitación-emisión.

Los datos generados fueron empleados para predecir las concentraciones del pesticida usando un calibrado de segundo orden.

Tabla 5. Concentraciones en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de imidacloprid, clotianidina, tiametoxam y fipronil del set de validación con interferentes.

Muestra	Concentración $\mu\text{g ml}^{-1}$			
	Imidacloprid	Clotianidina	Tiametoxam	Fipronil
1	0,72	0,28	0,38	0,49
2	0,22	0,05	0,77	1,48
3	0,44	0,10	0,80	1,49
4	0,38	0,82	0,19	0,45
5	0,64	0,69	0,49	0,28
6	0,5	0,32	0,45	0,57
7	0,29	0,95	0,65	0,34
8	0,68	0,03	0,71	1,38
9	0,20	0,44	0,75	1,07
10	0,58	0,25	0,27	0,72

4.5.4- Set de muestras de validación con interferentes sometido a extracción.

Con el objetivo de evaluar la capacidad del modelo de predecir imidacloprid en presencia de potenciales interferentes y de la eficiencia de extracción de la DLLME, se preparó un conjunto de 10 muestras de validación en agua y se sometió al proceso de extracción. El set de validación fue preparado de acuerdo al procedimiento de preparación de muestras descrito en la sección 4.4.1, utilizando el mismo intervalo de concentraciones definido en el set de validación con interferentes (tabla 5), pero con una factor de dilución de 50 al considerar la concentración que se produce en la DLLME (10ml/0,2 ml). Posterior a la irradiación se obtuvieron los espectros de excitación-emisión y los datos generados fueron empleados para predecir las concentraciones del pesticida usando un calibrado de segundo orden.

Posteriormente se preparó un nuevo set de validación sometiendo a extracción con DLLME bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para ser analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) como método de referencia y con el fin de evaluar la eficiencia de extracción de forma independiente de la predicción con U-PLS/RBL.

4.6- Muestras para el estudio de la precisión intra e inter día.

En el estudio de la precisión intra e inter día se trabajó utilizando el procedimiento descrito en la sección 4.4. Para la precisión intra día se trabajó con un conjunto de 3 muestras de igual concentración por día fortificadas a 6, 10 y 15 ng ml⁻¹ de imidacloprid. En el caso del estudio de la reproducibilidad o precisión inter día se trabajó con dos muestras a una concentración de 10 ng ml⁻¹ por tres días consecutivos. Este estudio se realizó tanto para imidacloprid sin interferentes como para imidacloprid con potenciales interferentes (pesticidas neonicotinoides y fipronil).

4.7- Estudio complementario sobre extracción en fase sólida con C18

De forma complementaria se realizó un estudio de extracción y pre-concentración de los pesticidas en fase sólida con columnas de C-18 Supelclean ENVI-18 de 500mg Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) para el set de validación con interferentes (tabla 5). Las columnas fueron activadas con 3ml de metanol y 3ml de agua nano, luego se agregó 10ml de muestra y se realizó una limpieza con 10ml de agua nano. Posteriormente las columnas fueron secadas con una corriente de nitrógeno por 5 minutos y fueron eluidas con 3ml de metanol. Finalmente el eluato es evaporado a sequedad con una corriente de nitrógeno sobre un bloque calefaccionado a 40° C, siendo reconstituido en 0,2ml de buffer fosfato 0,01M a pH 11,5 y sometido a irradiación de acuerdo a lo expuesto en la sección 4.5.4.

4.8- Aplicación en muestras reales.

Finalmente se preparó un set de 10 muestras de agua de distinto origen previa filtración con membranas de 0,20 μm Minisart [®], Sartorius (aguas de lago, pozo, acequia, canal, de tratamiento de RILES, potable y mineral) para ser analizados con el método descrito en la sección 4.4. Para cada muestra de agua se preparó un blanco (muestra filtrada) y dos fortificados a una concentración de 10ng ml^{-1} de imidacloprid. Cinco de estas muestras (aguas de pozo, acequia, canal, potable y mineral) fueron igualmente fortificadas con imidacloprid y sometidas a SPE con C18 en lugar de DLLME, antes de la irradiación.

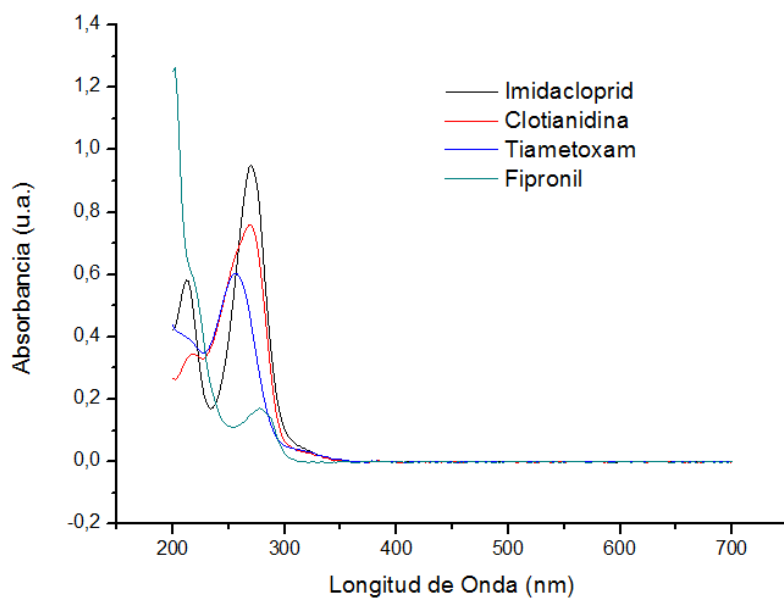
5- RESULTADOS Y DISCUSIONES.

5.1- Espectros de absorción, excitación-emisión de imidacloprid y de potenciales interferentes (clotianidina, tiametoxam y fipronil).

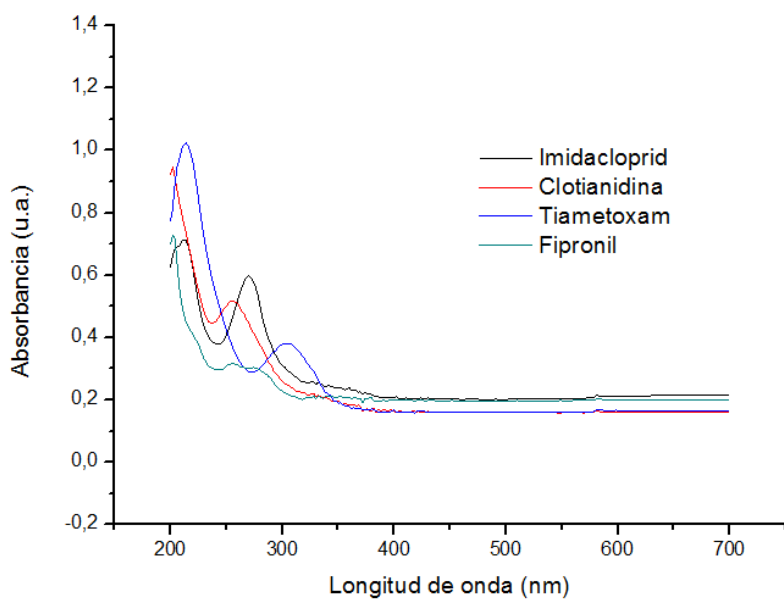
Se obtuvieron los espectros de absorción de imidacloprid y de potenciales interferentes (clotianidina, tiametoxam y fipronil) en acetonitrilo a una concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, con la finalidad de determinar los máximos de absorción de cada compuesto. Luego se obtuvieron los espectros de absorción de estos mismos compuestos luego de su irradiación por 25 segundos a 254 nm, para lo cual se prepararon en buffer fosfato a una concentración de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, excepto para fipronil, el cual fue preparado a una concentración de $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ debido a su baja solubilidad en agua. En la figura 6A se presentan los espectros de absorción de estos compuestos en acetonitrilo y en la figura 6B se muestran los espectros de absorción posterior a la irradiación.

Posteriormente se obtuvieron los espectros de excitación-emisión de cada uno de los compuestos luego de ser irradiados en buffer fosfato a una concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los espectros de excitación-emisión se presentan en la figura 8.

Al comparar las figuras 6 A y B se observa que los compuestos que presentan un mayor cambio en sus espectros luego de la irradiación son tiametoxam, clotianidina y fipronil; mientras que para imidacloprid este cambio es menor. Esto indica que para los tres primeros hay un mayor cambio en su estructura química durante la irradiación, no así para imidacloprid.



A



B

Figura 6. Espectros de absorción de (A) compuestos sin irradiar en AcN y (B) compuestos irradiados en buffer fosfato para imidacloprid (negro), clotianidina (rojo), tiametoxam (azul) y fipronil (verde).

Cabe mencionar que sólo en el caso de imidacloprid se ha aislado e identificado el producto generado luego de una irradiación con luz UV (Figura 7) (Vilchez y col, 2001). Este compuesto presenta fluorescencia nativa, tal como se observa en el espectro de excitación-emisión obtenido en este trabajo (Figura 8 A); con un máximo de excitación a 340 nm y de emisión a 380 nm. Sin embargo, el rendimiento cuántico del foto producto de imidacloprid es bajo.

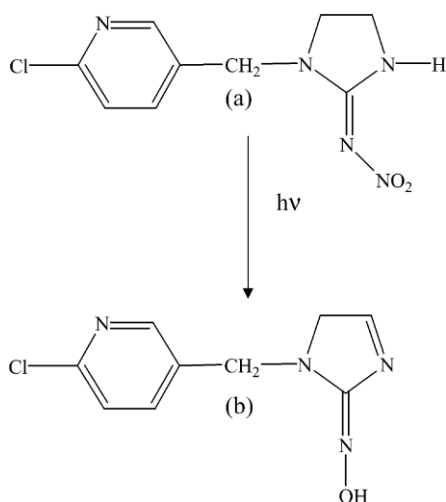


Figura 7. Estructuras de (a) imidacloprid y (b) 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-2-(hidroxiimino)-3,4-dihidroimidazolideno.

En cuanto a los otros pesticidas incluidos en este estudio como potenciales interferentes en la cuantificación de imidacloprid, se observó que sólo clotianidina genera un foto producto con una fluorescencia apreciable, aunque menor que la de imidacloprid (Figura 8B). Los foto productos de tiametoxam y fipronil presentaron baja fluorescencia (Figuras 8 C y D)

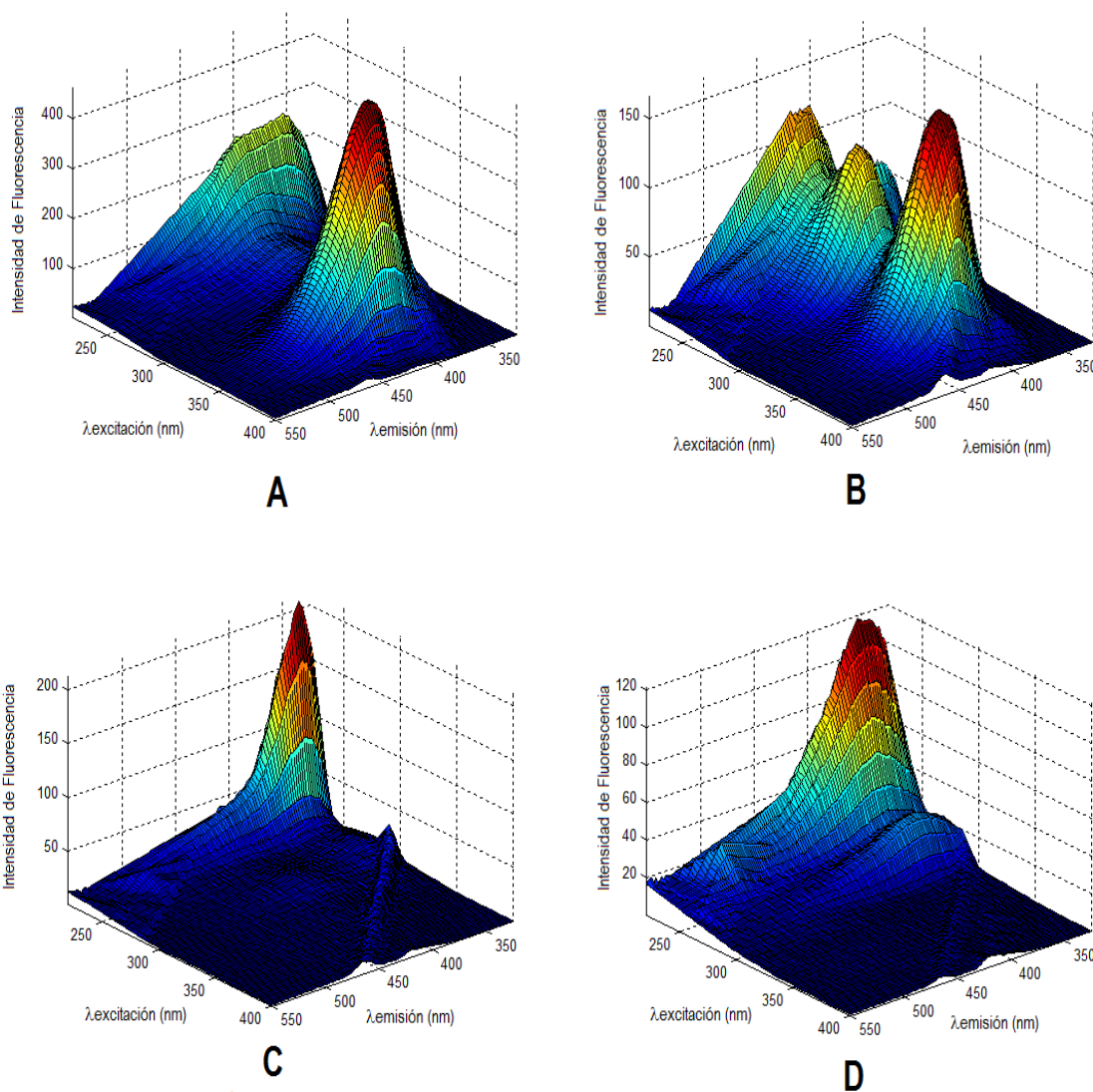


Figura 8. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión de (A) imidacloprid, (B) clotianidina, (C) tiametoxam y (D) fipronil a una concentración de $1\mu\text{g ml}^{-1}$ en buffer fosfato pH 11,5 luego de 25segundos de irradiación a 254nm.

A partir de los espectros de excitación-emisión se aprecia que uno de los máximos de excitación-emisión de clotianidina se solapa en gran medida con el máximo de excitación-emisión del imidacloprid. Este hecho pone en evidencia que la cuantificación de imidacloprid por fluorescencia total fotoinducida (espectros de excitación-emisión), en presencia de clotianidina, requiere de las herramientas apropiadas como la calibración multivariada de segundo orden.

Sumado a esto se hace fundamental una adecuada y a la vez simple preparación de las muestras para lograr bajos límites de cuantificación dado el bajo rendimiento cuántico que tiene el foto producto de imidacloprid.

5.2- Optimización del método.

5.2.1- Fotoinducción de imidacloprid.

5.2.1.1- Estudio del tiempo de exposición de imidacloprid a la radiación.

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de irradiación para lograr una mayor fluorescencia del imidacloprid, se evaluó la cinética de formación de su fotoproducto fluorescente entre 5 y 50 segundos a una concentración de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 9).

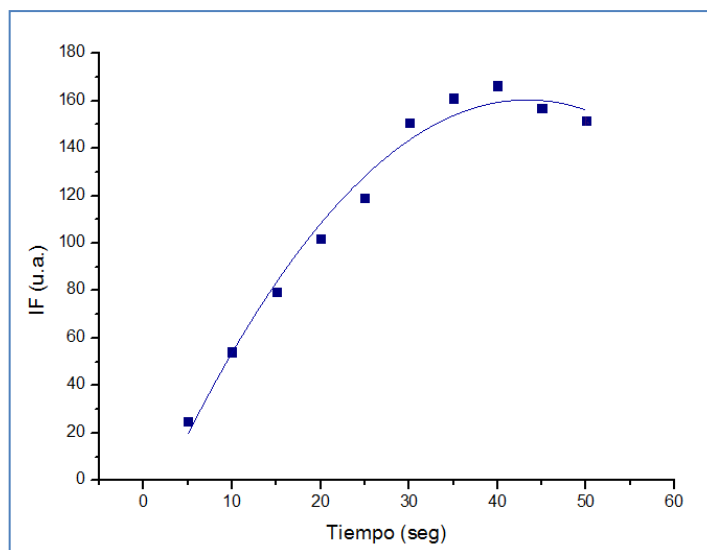


Figura 9. Cinética de formación del fotoproducto fluorescente de imidacloprid a una concentración de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Se observa que la mayor intensidad de fluorescencia se da para un tiempo entre 35 y 45 segundos. Sin embargo, al realizar curvas de calibrado con patrones irradiados a tiempos mayores a 25 segundos se observó una rápida pérdida de linealidad a bajas concentraciones, lo que se podría deber a una degradación del compuesto debido a hidrólisis, oxidación o formación de otros isómeros del imidacloprid en presencia de agua (Wamhoff y col, 1999). Por tal motivo se estableció un tiempo de 25 segundos para la irradiación.

5.2.1.2- Estudio del tipo de celda a utilizar.

Dado que se contaba con tres alternativas de celda donde era factible depositar la muestra irradiada para obtener sus MEE (100, 400 y 1000 μl), se realizó un estudio para seleccionar la celda más adecuada para ello. En el primer caso (100 μl) la muestra no necesitó dilución, ya que eran coincidentes los volúmenes del capilar usado para irradiar las muestras y el de la celda. Mientras que para las otras dos celdas (400 y 1000 μl), las concentraciones de las muestras irradiadas fueron 4 y 10 veces más concentradas. En todos los casos las concentraciones finales para imidacloprid fueron de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75 y 1,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Para el análisis de los datos se utilizó calibración univariada y multivariada; obteniéndose datos de una, dos y tres vías. En la tabla 6 se resumen las cifras de mérito de las curvas de calibrado obtenidas para las tres celdas usadas.

Tabla 6. Cifras de mérito de las curvas de calibrado obtenidas para las tres celdas usadas.

Regresión univariada						
Longitud de onda (nm)	Tipo de celda	Rango lineal	r	SEN ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
410	0,1 ml		0,984	0,06	0,18	0,55
	0,4 ml	0,1- 1,25	0,972	0,08	0,26	0,78
	1 ml		0,972	0,07	0,24	0,74
Regresión multivariada						
Longitud de onda (nm)	Tipo de celda	Rango lineal	r	y^{-1} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
PLS 374-424	0,1 ml		0,987	0,003	0,009	0,031
	0,4 ml	0,1- 1,25	0,991	0,003	0,010	0,033
	1 ml		0,978	0,003	0,008	0,025
	0,1 ml		0,943	0,004	0,012	0,039
	0,4 ml	0,1- 0,75	0,972	0,003	0,009	0,031
	1 ml		0,993	0,003	0,009	0,029
U-PLS λ_{exc} 320-375 λ_{em} 390- 480	0,1 ml		0,995	0,0006	0,002	0,006
	0,4 ml	0,1- 1,25	0,999	0,0004	0,001	0,004
	1 ml		0,984	0,0007	0,002	0,007
	0,1 ml		0,946	0,0004	0,001	0,004
	0,4 ml	0,1- 0,75	0,996	0,002	0,006	0,019
	1 ml		0,996	0,001	0,003	0,011

En la regresión univariada se observa que los mejores resultados, tanto de sensibilidad ($S_{y/x} / b$; donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión y b pendiente) como de límites de detección y cuantificación se dan para la celda de 100 μl . En el caso de la regresión multivariada, los resultados son mejores para U-PLS y para las microceldas de 100 y 400 μl . Por otro lado, no se observan diferencias significativas en los parámetros analíticos para estas celdas en el intervalo lineal desde 0,1- 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La dilución que se debe

realizar para las celdas de mayor volumen, particularmente para la de 1000 μl , impacta negativamente en la calidad del calibrado.

Además, se realizó un estudio para determinar la precisión de las mediciones, para lo cual se analizó una muestra de concentración 0,1; 0,5 y 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en 2 días diferentes para cada celda (tabla 7).

Tabla 7. Precisión de las medidas para las celdas de 0,1; 0,4 y 1 ml.

Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,1 ml	0,4 ml	1ml
	RSD	RSD	RSD
0,1	4,0	1,5	28,2
0,5	5,3	5,0	0,3
1,25	10,8	15,0	5,9

Se observa que la desviación estándar relativa (RSD) es baja (menor al 6%) para las microceldas de 100 y 400 μl a bajas concentraciones; sin embargo, a una concentración de 1,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ la dispersión aumenta, esto se puede deber a que el rango lineal se mantendría aproximadamente hasta 0,75 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tal como se muestra en la tabla 6. Con respecto a la celda de 1ml, la dispersión es muy alta a bajas concentraciones, debido probablemente a la dilución luego de irradiar la muestra como ya se mencionó arriba.

Debido a lo expuesto anteriormente, se decidió trabajar con la celda de 100 μl , puesto que dentro del rango lineal hay una baja dispersión de los datos, se obtienen buenos parámetros analíticos y no es necesario realizar dilución luego de irradiar la muestra.

Con los resultados obtenidos anteriormente se estableció que para la fotoinducción de la muestras era necesario utilizar el procedimiento descrito en la sección 4.4.2. Bajo estas condiciones se obtuvieron los parámetros analíticos para la determinación de imidacloprid.

5.2.2- Parámetros analíticos de la determinación de imidacloprid por fluorescencia fotoinducida.

Se obtuvieron los principales parámetros analíticos de la determinación de imidacloprid mediante fluorescencia fotoinducida asociada a calibración univariada y multivariada. Para la calibración univariada se consideró la longitud de onda de máxima emisión para imidacloprid (λ_{em} 410nm); estos datos se obtuvieron para fluorescencia clásica y para fluorescencia total. La calibración multivariada de dos y tres vías se realizó mediante mínimos cuadrados parciales (PLS) y mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS), respectivamente. Para construir los modelos de calibración de segundo orden es necesario obtener las matrices de excitación-emisión (MEE) en un intervalo espectral amplio, que incluya el máximo de emisión de imidacloprid. Para PLS se trabajó con un intervalo de longitud de onda 369-419 nm (λ_{ex} 355nm) y datos centrados, en el caso de U-PLS el intervalo utilizado fue λ_{exc} 310-370nm y λ_{em} 390-470nm y datos centrados. Los espectros de emisión (PLS) y las matrices de excitación-emisión (MEE) fueron correlacionadas con la concentración de imidacloprid presente en las muestras de calibrado preparadas en buffer fosfato. Para la calibración multivariada los parámetros analíticos fueron obtenidos de acuerdo con Olivieri y col. (2006). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. Cifras de mérito de la determinación de imidacloprid mediante espectroscopía de fluorescencia fotoinducida asociada a calibración univariada y multivariada.

Regresión univariada						
Longitud de onda (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	r	Sb/b (%)	$S_{y/x}/b$ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Fluo Clásica 410	0,1- 1,25	0,9973	0,013	0,021	0,071	0,215
	0,1- 0,50	0,9882	0,036	0,019	0,064	0,194
Fluo total 410	0,1- 1,25	0,9940	0,020	0,032	0,106	0,323
	0,1- 0,75	0,9889	0,035	0,019	0,062	0,188
	0,1- 0,50	0,9950	0,021	0,017	0,058	0,175

Regresión multivariada						
Longitud de onda (nm)	Rango lineal ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	r	Número de factores	y^{-1} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
PLS 369-419	0,1- 1,25	0,9989	2	0,002	0,006	0,019
	0,1- 0,50	0,9954	2	0,002	0,005	0,016
U-PLS	0,1- 1,25	0,9978	2	0,001	0,004	0,012
λ_{exc} 310-370	0,1- 0,75	0,9995	3	0,001	0,003	0,010
λ_{em} 390-470	0,1- 0,50	0,9997	3	0,001	0,004	0,013

Para la regresión univariada obtenida mediante fluorescencia clásica se obtuvieron coeficientes de correlación (r) entre 0,9954 y 0,9989; la desviación estándar relativa de la pendiente (Sb/b; donde Sb es la desviación estándar de la pendiente y b es la pendiente) que otorga una mejor representación de la linealidad de los datos analíticos fue menor a 0,036 y la sensibilidad analítica ($S_{y/x}/b$; donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión y b la pendiente) que indica la mínima diferencia de concentración que el método es capaz de detectar fue menor a $0,019 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los límites de detección ($\text{LOD} = 3,3 * (S_{y/x} / b)$) y cuantificación ($\text{LOQ} = 10 * (S_{y/x} / b)$) fueron cercanos a 0,07 y $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Para la regresión univariada obtenida mediante fluorescencia total las cifras de mérito son similares, obteniéndose coeficientes de correlación (r) entre 0,9889 y 0,9950.

La desviación estándar relativa de la pendiente (S_b/b) fue igual o menor que 0,035 y la sensibilidad analítica fue igual o menor que $0,032 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron iguales o menores que $0,106$ y $0,323 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente. Con respecto a la linealidad, se observa que los mejores resultados se obtienen en el intervalo dinámico de $0,1-0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para la fluorescencia clásica y de $0,1-0,75 \mu\text{g ml}^{-1}$ para fluorescencia total (S_b/b).

Para la regresión multivariada se observa que en general hay una mayor sensibilidad y menores límites de detección y cuantificación que para la regresión univariada, lo que se debe a la mayor cantidad de información utilizada para construir los modelos de calibrado. Los mejores resultados se obtienen aplicando U-PLS a los datos de tres vías en el rango lineal de $0,1-0,75 \mu\text{g ml}^{-1}$, dando como resultado una sensibilidad analítica (inverso de la sensibilidad analítica (y): $y^{-1}=s_x/\text{SEN}$, donde s_x es el ruido instrumental y SEN es la sensibilidad) de $0,001 \mu\text{g ml}^{-1}$, además de límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de $0,003$ y $0,009 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectivamente.

5.2.3- Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).

5.2.3.1-Diseño de screening.

Con la finalidad de determinar los factores que influyen en el porcentaje de recuperación de la extracción se realizó un diseño factorial $2^{(5-1)}$, los factores estudiados se presentan en la tabla 2 de la sección 4.3.2.1. Se estableció que los cinco factores experimentales evaluados influyen en la eficiencia de la DLLME. Los resultados obtenidos del diseño de screening se muestran en la figura 10.

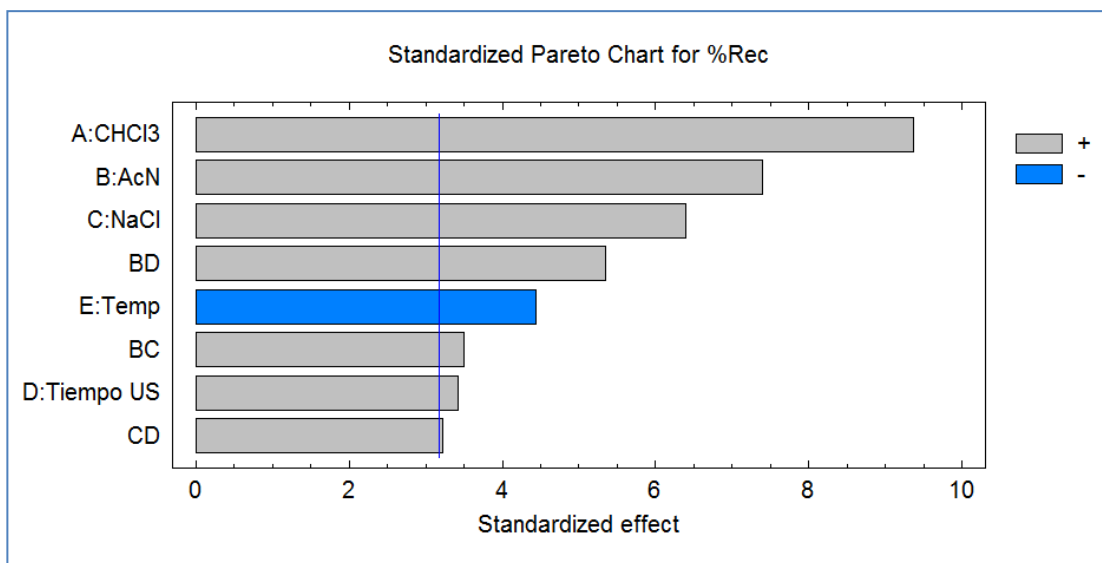


Figura 10. Diagrama pareto estandarizada de la influencia de cada factor en el porcentaje de recuperación de la extracción.

En el diagrama pareto estandarizado se observa que cuatro de los cinco factores estudiados tienen una influencia positiva sobre la extracción (95% de confianza). Estos son en orden decreciente el volumen de cloroformo (CHCl_3), el volumen de acetonitrilo (AcN), el porcentaje de cloruro de sodio (%NaCl) y el tiempo de ultrasonido. La temperatura de ultrasonido tiene una influencia negativa. Debido a esto se consideró necesario optimizar los tres factores que

tienen una mayor influencia sobre la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME): el volumen de cloroformo (CHCl_3) y acetonitrilo (AcN), además del porcentaje de cloruro de sodio (%NaCl). Con respecto al tiempo de ultrasonido, éste se estableció en 5 minutos y se trabajó a temperatura ambiente, ya que este factor tuvo un efecto negativo en el intervalo evaluado.

5.2.3.2- Diseño de Optimización.

Con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para la extracción de imidacloprid desde agua se realizó un diseño de experimento Dohelert, el cual permite estudiar los factores que tienen una mayor influencia sobre la respuesta de forma rápida y a distintos niveles. La matriz de experimentos realizados y los niveles de cada factor estudiado se presentan en la tabla 3 de la sección 4.3.2.2.

Bajo ciertas condiciones experimentales se observaron señales de fluorescencia altas en los blancos debido a interferencias no determinadas, lo que llevó a tener recuperaciones mayores al 100%. Por ello se decidió poner una restricción correspondiente a fijar un valor objetivo de 100% en la optimización. Esto se realizó aplicando la función de deseabilidad de Derringer (Derringer y col, 1980) para sancionar valores menores y mayores al 100% (límite inferior 39%, superior 170%, pesos de la de zona de incremento y decrecimiento 1).

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos de la optimización a través de la superficie de respuesta estimada y del contorno de superficie de respuesta estimada, considerando la restricción impuesta mediante la deseabilidad.

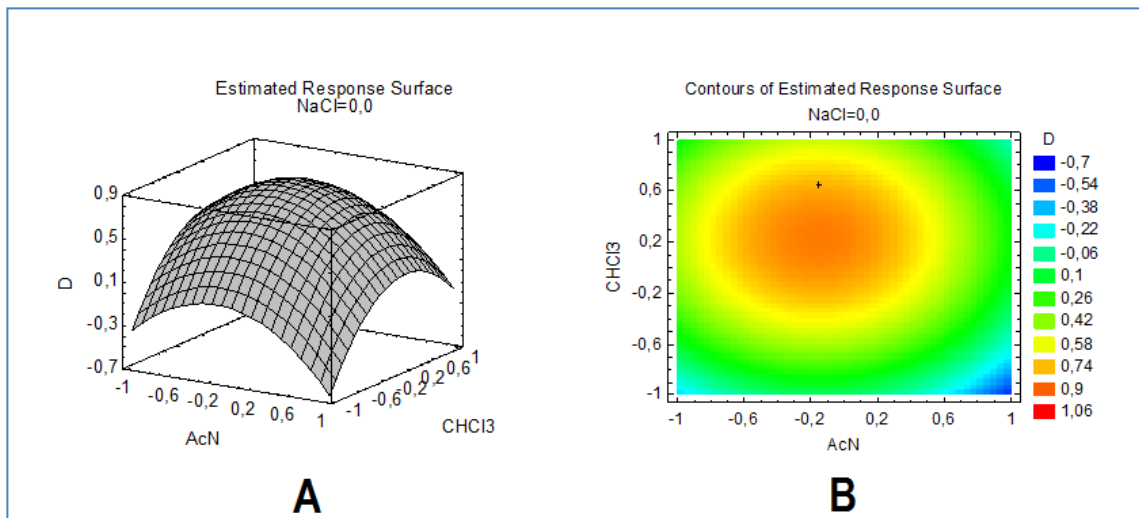


Figura 11. Resultado de la optimización de la extracción. (A) Superficie de respuesta estimada para la optimización de la extracción. (B) Contorno de superficie de la respuesta estimada, en donde (+) indica las condiciones óptimas de la extracción considerando un porcentaje de cloruro de sodio de 10% (considera restricción de valor objetivo 100%).

Con estos resultados fue posible determinar la condición óptima de los factores estudiados para la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), los cuales fueron: volumen de acetonitrilo (AcN) 2ml, volumen de cloroformo (CHCl_3) 0,3ml y porcentaje de cloruro de sodio (NaCl) 10% (procedimiento descrito en la sección 4.4.1). Condiciones similares han sido reportadas por Wu y col. (2011) con algunas modificaciones.

Al realizar la DLLME al set de validación (Tabla 5) y determinar el imidacloprid mediante HPLC-DAD, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 50 y 71%, con un promedio de $61 \pm 8 \%$ (Tabla C en anexo). Con excepción de un par de muestras, de acuerdo a la AOAC (Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods 2002) el porcentaje de recuperación obtenido se encuentra dentro del intervalo aceptable (60-115% para 10 ng ml^{-1}) considerando la baja concentración del analito en el set de muestras (4 a 14 ng ml^{-1}). Sin embargo, el método presenta una reproducibilidad más bien pobre (RSD 13%).

5.3- Validación del método.

Una vez optimizadas tanto la etapa de determinación como la de extracción de imidacloprid, se procedió a validar el método propuesto. Para ello se prepararon 3 set de validación de complejidad creciente con 10 muestras cada uno, a concentraciones de imidacloprid entre 0,2- 0,72 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los primeros dos sets de validación se realizaron en buffer, el primero sólo con imidacloprid, el segundo en presencia de interferentes (clotianidina, thiamethoxam y fipronil) y el tercero incluyendo la etapa previa de DLLME en presencia de interferentes. Las MEE obtenidas fueron usadas para predecir la concentración de imidacloprid utilizando U-PLS/RBL y PARAFAC, los resultados obtenidos para los dos primeros sets se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en los sets de validación en solvente (buffer).

	U-PLS/RBL		PARAFAC
	Sin Interferentes	Con Interferentes	Con Interferentes
RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,02	0,04	0,05
REP (%)	7	9	10
y^{-1} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,003	0,007	0,001

En la tabla 9 se observa que se obtuvieron buenas predicciones, siendo el número óptimo de factores utilizados 3, el cual se determina calculando la razón $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A^*)$, donde PRESS es la suma de errores cuadrados de predicción, definido como $\text{PRESS} = \sum (y_{\text{nominal}} - y_{\text{predicho}})^2$, A es el número de factores a probar y A^* corresponde al número de factor para el cual el valor de PRESS es mínimo. El número óptimo de factores será el primer valor para el cual la probabilidad asociada sea menor al 75% y F sea menor que 1. Para la validación con interferentes fue necesario utilizar la bilinearización residual (RBL), ya que las muestras tienen componentes no incluidos en el calibrado (clotianidina) que emiten fluorescencia en la misma zona que el imidacloprid. El número de componentes RBL fue estimado entre 1 y 3

dependiendo de la muestra analizada, lo que demuestra que además del clotianidina podrían existir otros interferentes en las muestras (compuestos) producidos durante el proceso de irradiación. El solapamiento espectral entre las MEE de imidacloprid y clotianidina se muestra en la Figura 12, donde no se observan mayores diferencias entre una muestra que contiene sólo imidacloprid y otra que contiene ambos analitos. Esta situación ya había sido destacada previamente (Figura 8).

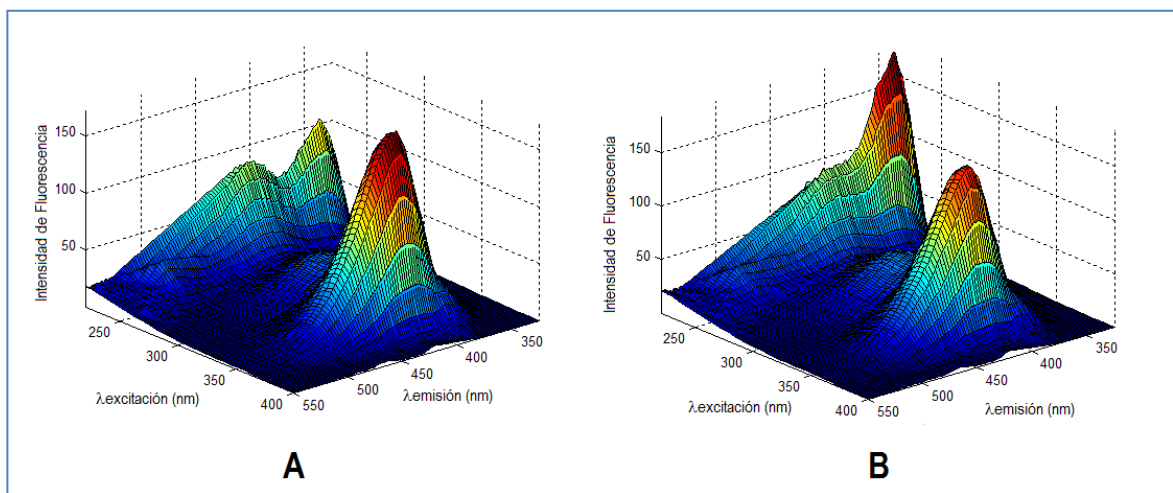


Figura 12. Gráficos tridimensionales de las matrices de excitación-emisión de: (A) muestra de validación que contiene sólo imidacloprid a una concentración de $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, (B) muestra de validación que contiene además clotianidina $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, tiametoxam $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ y fipronil $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Con respecto al error cuadrado medio de predicción (RMSEP, en el cual $\text{RMSEP} = [(1/n) \sum (\text{C}_{\text{nominal}} - \text{C}_{\text{predicho}})^2]^{1/2}$, donde n es el número de muestras predichas y $\text{C}_{\text{nominal}}$ y $\text{C}_{\text{predicho}}$ son las concentraciones nominal y predichas, respectivamente) que da cuenta de la exactitud de los resultados, es $0,02$ y $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ para el set de validación sin interferentes y con interferentes respectivamente. El error relativo de predicción (REP, donde $\text{REP} = (100 \cdot \text{RMSEP} / C)$ en el cual C es la concentración promedio de validación), que nos indica con más claridad la exactitud de los resultados, fue menor a 9%, y la sensibilidad analítica igual o menor que $0,07 \mu\text{g ml}^{-1}$.

En el análisis de segundo orden utilizando PARAFAC se emplearon 2 componentes, con una consistencia de núcleo de 100%, lo que concuerda con el analito de interés más la interferencia producida por el clotianidina en la zona de fluorescencia del imidacloprid. Para este algoritmo se obtuvo un REP de 10% respecto del valor nominal, además de una sensibilidad analítica de 0,001 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y un límite de detección (LOD) de 0,08ng ml^{-1} .

Como ya se mencionó previamente, para analizar la capacidad predictiva del modelo así como la eficiencia de extracción de la DLLME, se realizó un tercer set de validación con imidacloprid en presencia de interferentes agregando la etapa de extracción. Las MEE obtenidas fueron usadas para predecir la concentración de imidacloprid utilizando U-PLS/RBL y PARAFAC. Los resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid utilizando estos algoritmos de segundo orden se resumen en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción.

	U-PLS/RBL		PARAFAC
	2 RBL	1 RBL	
RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,12	0,19	0,18
REP (%)	26	40	39
y^{-1} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,069	0,008	0,001
LOD (ng ml^{-1})*	0,64	0,48	0,58

* El LOD considera el factor de concentración logrado luego de DLLME (10 ml/ 0.2 ml)

Se observa que fue necesaria la utilización de RBL, debido al solapamiento espectral del clotianidina. Además, se observó una mayor complejidad en las MEE obtenidas para estas muestras debido muy probablemente a compuestos que se co-extrajeran en la extracción. Si bien esto dificultó la determinación de imidacloprid, el algoritmo U-PLS/RBL permitió de igual modo determinar la concentración del analito en estas muestras con un error aceptable, tal como se comprobó posteriormente al comparar los resultados con los obtenidos por HPLC.

Se obtuvieron porcentajes de recuperación, en relación al valor nominal, entre 56-72% y entre 63-88% al realizar el análisis mediante U-PLS/RBL con 1 y 2 RBL, respectivamente. Como consecuencia, los errores relativos de predicción (REP) observados fueron elevados (26% para 2RBL y 40% para 1 RBL), lo que puede deberse a una baja recuperación en la DLLME y/o a problemas en la predicción de la concentración mediante U-PLS/RBL. Por otra parte, los límites de detección (LOD) fueron 0,48 y 0,64 ng ml⁻¹ para 1 y 2 RBL, respectivamente; considerando el factor de concentración logrado luego de DLLME (10 ml/ 0.2 ml).

Al realizar el análisis de segundo orden utilizando PARAFAC se observa que los resultados son similares a los obtenidos mediante U-PLS/RBL con 1 RBL, obteniéndose un error relativo de predicción (REP) de 39% respecto al valor nominal, además de una sensibilidad analítica de 0,001 μg ml⁻¹ y un límite de detección (LOD) de 0,58 ng ml⁻¹. Para este análisis se utilizaron 2 componentes con una consistencia de núcleo de 100% lo que, como se mencionó anteriormente, concuerda con la interferencia producida por el clotianidina en la zona de fluorescencia del imidacloprid.

Al realizar la DLLME al set de validación y determinar el imidacloprid mediante HPLC-DAD como método de referencia, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 50 y 71% (Tabla C en anexo). Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante U-PLS/RBL y PARAFAC, mediante regresión lineal y región elíptica de confianza conjunta (EJCR). Los resultados se presentan en la Figura 13. Adicionalmente en la Tabla 11 se presenta los errores de predicción respecto de los valores obtenidos con HPLC.

Tabla 11. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción respecto de HPLC.

	U-PLS/RBL		PARAFAC
	2 RBL	1 RBL	
RMSEP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,074	0,041	0,159
REP (%)	16	8,7	34

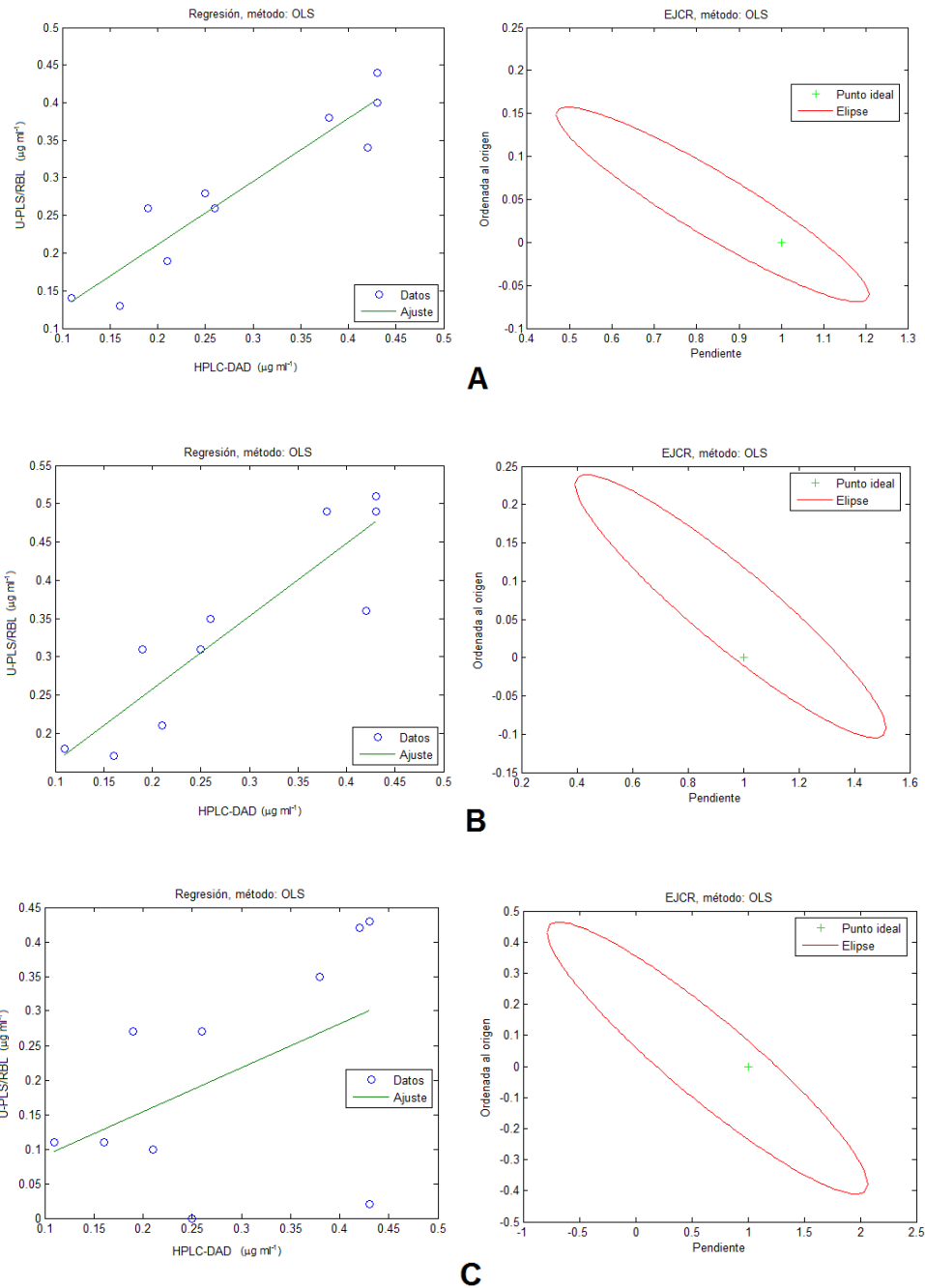


Figura 13. Gráficos de las concentraciones predichas para imidacloprid mediante U-PLS/RBL en función de los valores obtenidos por HPLC-DAD. (A) para U-PLS con 1 RBL, (B) para U-PLS con 2 RBL y (C) para PARAFAC. Además se presentan las respectivas regiones elípticas de confianza (95% de confianza), donde (+) en la elipse indica el punto teórico (1,0) de pendiente e intercepto.

Se observa que para U-PLS/RBL con 1 RBL hay una buena correlación entre los valores obtenidos por este método y los determinados mediante HPLC. Además el punto teórico (1,0) se encuentra dentro de la elipse de confianza, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las concentraciones predichas mediante este método propuesto y las obtenidas mediante HPLC-DAD. El error relativo promedio de sólo un 8,7% corrobora lo anterior. Algo similar en términos de la correlación se observa para los resultados obtenidos mediante U-PLS/RBL con 2RBL. Sin embargo, se observa que a pesar de que el punto teórico se encuentra dentro de la elipse, esta es de mayor amplitud indicando una mayor dispersión de valores y cierta compensación entre estos. Esto se puede deber a que mediante U-PLS/RBL con 2 RBL se estarían sobreestimando las concentraciones del set de validación, ya que como se mencionó anteriormente se pueden estar produciendo interferencias durante la etapa de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), como la co-extracción de otros compuestos que pueden influir en la predicción. Sin embargo, el error relativo promedio de 16% para este caso es aceptable (Tabla 11).

Con respecto a los valores predichos mediante PARAFAC, se observa que hay una alta dispersión de los datos al compararlos con los valores obtenidos mediante HPLC-DAD. Ello demuestra que PARAFAC no hizo una correcta predicción de los valores “reales” presentes en los extractos obtenidos luego de la DLLME. En este caso el error relativo promedio fue de 34% confirmando lo anterior. Si bien la región elíptica de confianza conjunta (EJCR) contiene al punto (1,0), esto sólo se debe a una compensación de errores y a la gran dispersión de datos ya que en este caso la elipse presenta gran amplitud.

5.4- Precisión del método.

Este estudio se realizó en ausencia y en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil). Para evaluar la precisión intra-día se trabajó con tres muestras a tres concentraciones iniciales de imidacloprid en agua (6, 10 y 15 ng ml⁻¹). Para evaluar la precisión inter-día se trabajó con dos muestras a una concentración de 10 ng ml⁻¹, por tres días consecutivos. En la tabla 12 se presentan los resultados obtenidos. Para la precisión intra-día la desviación estándar relativa (RSD) fue menor al 13% con porcentajes de recuperación iguales o mayores al 98%, excepto para las muestras de mayor concentración con presencia de interferentes. La RSD para la precisión inter-día fue menor al 7% en ambos casos, con porcentajes de recuperación cercanos al 100%. Se observa que la mayor dispersión se presentó para las muestras cuya concentración está en los extremos del calibrado (6 y 15 ng ml⁻¹), siendo menos relevante el efecto de los interferentes. Esto demuestra la buena capacidad de predicción del U-PLS/RBL en presencia de compuestos no modelados (ventaja de segundo orden). En general estos resultados son satisfactorios considerando el bajo nivel de concentración del analito en las muestras de agua.

Tabla 12. Precisión intra-día (n=3) e inter-día (n=6) para la recuperación de imidacloprid a diferentes concentraciones al aplicar DLLME-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.

	Concentración ng ml ⁻¹	Precisión inter día		Precisión intra día	
		RSD	%Rec	RSD	%Rec
Sin Interferentes	6			12	104
	10	6,5	105	5,4	98
	15			13	99
Con Interferentes	6			12	105
	10	5,4	107	7,7	104
	15			8,4	66

5.5- Aplicación en muestras reales.

Con la finalidad de determinar la capacidad predictiva del método se analizaron diez muestras de agua de distinto origen previa filtración (lago, pozo, acequia, canal, plantas de tratamiento, potable y mineral). Para cada muestra se analizó un blanco y dos fortificados a una concentración de 10 ng ml⁻¹. Las recuperaciones obtenidas se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Recuperación de imidacloprid desde muestras de agua de diferente origen al aplicar DLLME-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.

Muestra	% Recuperación
Lago Chungará, interior	46
Lago Chungará, orilla	57
Agua de pozo, Peñaflor	26
Planta tratamiento 1, afluyente	27
Planta tratamiento 1, efluente	47
Planta tratamiento 2, afluyente	91
Agua potable, Independencia	27
Agua mineral sin gas	93
Acequia, Pirque	83
Canal Los Choros, Huechuraba	80

Al analizar los resultados obtenidos se observa que aquellas muestras con una cantidad importante de materia orgánica disuelta (lago, planta de tratamiento¹) o con elevada dureza (potable Independencia, pozo) presentaron bajos porcentajes de recuperación. La obtención de dichos valores pueden estar asociadas a interferencia generadas por estos factores ya sea por disminución de la eficiencia en la extracción y la fotoinducción, y/o por un

incremento del error de predicción con UPLS/RBL. De hecho en el caso de estas muestras se observó una mayor complejidad en las matrices de excitación-emisión (MEE), asociado a compuestos co-extraídos en la extracción, dificultando la predicción de imidacloprid con los algoritmos de segundo orden. En el caso de las muestras con elevada dureza, la interferencia podría deberse a que el calcio presente en ellas forme un complejo con el grupo hidroxilo desprotonado del fotoproducto del imidacloprid, disminuyendo su rendimiento cuántico y consecuentemente entregando menores valores en la etapa de cuantificación.

5.6- Estudio complementario sobre extracción en fase sólida con C18.

En vista de las interferencias observadas al analizar las muestras reales aplicando DLLME, se realizó un estudio complementario para extraer imidacloprid desde muestras acuosas mediante extracción en fase sólida (SPE) con columnas de C18. Este es un método que permite extraer y concentrar el analito desde la muestra además de eliminar gran parte de las interferencias producidas por la matriz (clean-up) de forma rápida, fácil y con bajo consumo de solventes.

La elección de la fase C18 para SPE tuvo en consideración la buena separación lograda entre los pesticidas neonicotinoides y los interferentes encontrados en los extractos del DLLME, al utilizar cromatografía líquida en fase reversa con una columna C18. Por otra parte, varios autores han propuesto el uso de SPE con C18 como una buena alternativa para extraer pesticidas neonicotinoides desde diferentes matrices (Baskaran y col, 1997; Ettiene y col, 2012; Starner y col, 2012; Tisler y col, 2009; Wu y col, 2011).

5.6.1- Recuperación y precisión mediante SPE con C18.

Con la finalidad de determinar la recuperación y precisión de la extracción con SPE C18, se realizó un estudio de precisión intra-día e inter-día. Para evaluar la precisión intra-día se trabajó con dos muestras a una concentración de 10ng ml^{-1} . Para el estudio de la precisión inter-día se trabajó con dos muestras a una concentración de 10ng ml^{-1} por dos días consecutivos. En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos mediante SPE con C18 y DLLME sin presencia de interferentes.

Tabla 14. Precisión inter-día e intra-día para la recuperación de imidacloprid a una concentración de 10ng ml^{-1} mediante DLLME y SPE C18.

	Precisión inter día		Precisión intra día	
	RSD	%Rec	RSD	%Rec
DLLME	6,5	105	5,4	98
SPE C-18	0,7	117	5,6	114

Se observa que los resultados obtenidos mediante SPE C18 para la precisión inter-día son mejores que los obtenidos mediante DLLME. Lo que indica que esta técnica otorga una mayor reproducibilidad entre muestras, se obtuvo una desviación estándar relativa (RSD) de 0,7% y un porcentaje de recuperación de 117%. Con respecto a la precisión intra-día, se obtuvo un RSD de 5,6% y un porcentaje de recuperación de 114%. Estos valores son muy similares a los obtenidos mediante DLLME. En general, considerando la baja concentración del analito los resultados obtenidos son satisfactorios en ambos casos.

5.6.2- Set de validación mediante extracción en fase sólida C18.

Posteriormente se realizó un set de validación en presencia de interferentes (tabla 5) para analizar la eficiencia de SPE con columnas de C18. Para predecir la concentración de imidacloprid desde las MEE obtenidas se utilizaron los algoritmos de segundo orden U-PLS/RBL y PARAFAC. Los resultados estadísticos obtenidos se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción mediante SPE C18 y DLLME.

	SPE C-18 ^a		DLLME ^b	
	U-PLS/2RBL	PARAFAC	U-PLS/2RBL	PARAFAC
%REC ± SD	99 ± 25	111 ± 25	124 ± 25	77 ± 47
RMSEP (µg ml ⁻¹)	0,09	0,09	0,07	0,15
REP (%)	20	20	16	34
LOD (ng ml ⁻¹)	1,25	0,54	0,65	0,43

^a Obtenidos en relación al valor nominal de concentración.

^b Obtenidos en relación a la concentración determinada por HPLC en los extractos.

Al revisar los resultados estadísticos de la determinación de imidacloprid en el set de validación con extracción en fase sólida con columnas de C18, se observa que al utilizar el algoritmo de segundo orden U-PLS/RBL los resultados son satisfactorios, fue necesario el uso de 2 componentes RBL en todas las muestras debido a la interferencia que produce el clotianidina en la zona de fluorescencia de nuestro analito de interés (imidacloprid). Se obtuvo un error relativo de predicción (REP) de 20% respecto del valor nominal y un límite de detección (LOD) de 1,2ng ml⁻¹, considerando el factor de concentración logrado después de la SPE C18 (10ml/0,2ml).

El análisis de segundo orden utilizando PARAFAC se realizó con 2 componentes con una consistencia de núcleo de 100%, lo que nuevamente concuerda con la interferencia producida por el clotianidina. Se obtuvo un error relativo de predicción (REP) de un 20% respecto del valor nominal y un límite de detección (LOD) de 0,54ng ml⁻¹. Estos resultados son satisfactorios considerando el alto solapamiento espectral del clotianidina en la zona de fluorescencia del imidacloprid.

Si bien en el set de validación tratado con SPE C18 no se determinó el imidacloprid con HPLC, estudios paralelos por absorción molecular (cuyos detalles no se dan aquí) mostraron que la recuperación del imidacloprid desde muestras acuosas aplicando SPE C18 fue cuantitativa. De acuerdo a ello, los resultados obtenidos mediante ambos métodos de extracción son similares, excepto en el caso de DLLME utilizando el algoritmo de segundo orden PARAFAC, que como se mencionó anteriormente no hizo una correcta predicción de los valores “reales” presentes en la muestra; tal como se observa en la tabla 15. Es necesario mencionar que las matrices de excitación-emisión obtenidas luego de SPE son mucho más limpias que las obtenidas luego de DLLME, debido principalmente a que mediante la técnica DLLME se co-extraen otros compuestos que dificultan la determinación del imidacloprid.

5.6.3- Aplicación en muestras reales mediante extracción en fase sólida con C18.

Finalmente se analizaron 5 muestras de distinto origen previa filtración (aguas de pozo, acequia, canal, potable y mineral). Para cada muestra se analizó un blanco y un fortificado a una concentración de 10ng ml⁻¹. Las recuperaciones obtenidas se resumen en la tabla 16.

Tabla 16. Recuperación de imidacloprid desde muestras de agua de diferente origen al aplicar SPE C18-fluorescencia fotoinducida-UPLS/RBL.

Muestra	Recuperación (%)
Agua de pozo, Peñaflo	114
Agua Mineral sin gas	89
Canal Los Choros, Huechuraba	106
Agua de acequia, Pirque	64
Agua Potable, 29/01/2014	101

Al analizar los resultados obtenidos se observa que el porcentaje de recuperación de las muestras va desde un 63-114% lo que de acuerdo a la AOAC está dentro del rango aceptable debido a la baja concentración del analito (60-115% para concentraciones de 10 ng ml^{-1}). Al comparar estos resultados con los obtenidos mediante DLLME se observa que las recuperaciones son mejores, debido a que mediante la extracción en fase sólida se puede limpiar la muestra eliminando o disminuyendo de forma considerable los interferentes que pueden influir en la predicción del imidacloprid; en este caso particular la elevada dureza, ya que no se analizaron muestras con materia orgánica.

6- CONCLUSIONES.

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) con posterior fluorescencia inducida fotoquímicamente, asociada a calibración multivariada de segundo orden utilizando U-PLS/RBL demostró ser un método adecuado para determinar imidacloprid, al nivel de 10 ng ml^{-1} aproximadamente, en muestras de agua en presencia de potenciales interferentes (otros pesticidas neonicotinoides y fipronil).

A pesar de que clotianidina presentó un gran solapamiento espectral con el analito de interés, el modelo de calibración de segundo orden construido pudo predecir adecuadamente la concentración de imidacloprid en las muestras analizadas.

El método DLLME presentó un porcentaje de recuperación promedio de $61 \pm 8 \%$, considerado aceptable para las bajas concentraciones del analito evaluadas. Sin embargo, el método presenta una reproducibilidad más bien pobre (RSD 13%).

Si bien el método DLLME permitió extraer y pre concentrar el imidacloprid, también concentra interferentes que dificultan en parte la cuantificación posterior con fluorescencia asociada a calibración multivariada. Esto se traduce en una sobre exigencia al modelo de calibración y la necesidad de mayor experiencia por parte del usuario para obtener un resultado adecuado.

La determinación de imidacloprid en muestras reales presentó dificultades en la predicción del analito, especialmente en las muestras con un alto contenido de materia orgánica o con elevada dureza, lo que se atribuye a problemas durante la extracción y/o posterior cuantificación del imidacloprid.

Debido a los problemas observados con DLLME, se realizó un estudio complementario de SPE con columnas de C-18 asociada a la calibración multivariada. Para este método se obtuvieron en general mejores resultados que los obtenidos mediante DLLME en términos de recuperación y precisión. Se analizaron nuevamente algunas muestras reales, obteniéndose recuperaciones entre un 63-114%, las cuales no presentaron los problemas de interferencias producidas por la elevada dureza. Este método permite limpiar la muestra, además de extraer y pre-concentrar lo que facilita la determinación del imidacloprid en matrices complejas. Así, se plantea el desafío de seguir investigando la extracción en fase sólida (SPE) con columnas de C-18 para poder ser aplicado a diferentes matrices.

7- BIBLIOGRAFIA.

- ❖ AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, **2002**.
- ❖ Araujo, K; Ettiene, G; Hernández, M; Cáceres, A; Pérez, H., “Desarrollo de un método en línea para la determinación del insecticida imidacloprid en muestras de agua empleando detección por fluorescencia inducida fotoquímicamente”, Rev. Fac. Agron. (LUZ), **2012**, 29: 542-559.
- ❖ Baskaran S; Kookana, R; Naidu, R., “Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high performance liquid chromatography”, Journal of Chromatography, **1997**, 787: 271-275.
- ❖ Blacquièrre T., Smagghe G., Van Gestel C.A.M., Mommaerts V., “Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment”, Ecotoxicology, **2012**, 21: 973–992.
- ❖ Bro, R., "Multivariate calibration What is in chemometrics for the analytical chemist?" Analytica Chimica Acta, **2003**, 500: 185-194.
- ❖ Bro, R; Kiers, H, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", Journal of Chemometrics, **2003**, 17: 274–286.
- ❖ CCME, “Canadian Water Quality Guidelines: Imidacloprid”, **2007**, p. 2-40.
- ❖ Chemical Watch Factsheet, Imidacloprid, <http://www.beyondpesticides.org/infoservices/pesticidesandyou/Fall08/Imidacloprid.pdf>, última visita 23 de febrero 2014.
- ❖ Derringer, G.; Suich, R., "Simultaneous optimization of several response variables", Journal of Quality Technology, **1980**, vol. 12, N° 4: 214-219.
- ❖ Ding, T; Jacobs, D; Lavine, B., “Liquid chromatography-mass spectrometry identification of imidacloprid photolysis products”, Microchemical Journal, **2011**, 99: 535-541.
- ❖ Ding, T; Lavine, B., “Separation of imidacloprid and its degradation products using reversed phase liquid chromatography with water rich mobile phases”, Journal of Chromatography, **2011**, 1218: 9221-9226.

- ❖ EFSA, Regulación de Imidacloprid, www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3068.htm, última visita 26 de febrero 2014.
- ❖ Enviromental Fate of Imidacloprid, <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/lmidclprdfate2.pdf>, última visita 1 de abril 2014.
- ❖ Escandar, G; Faber, N; Goicoechea, H; Muñoz de la Peña, A; Olivieri, A; Poppi, R., “Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications”, *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26: 752-765.
- ❖ Escandar, G; Goicoechea, H; Muñoz de la Peña, A; Olivieri, A., “Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial”, *Analytica Chimica Acta*, **2014**, 806: 8-26.
- ❖ Ettiene, G; Bauza, R; R. Plata, María; M. Contento, A; Ríos, A., “Determination of neonicotinois insecticides in enviromental samples by micellar electrokinetic chromatography using solid-phase treatments”, *Journal of Electrophoresis*, **2012**, 33: 2969-2977.
- ❖ Farooqui T., “A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis”, *Neurochemistry International*, **2013**, 63: 122–136.
- ❖ Fernandez-Alba, A; Valverde, A; Aguera, A; Contreras, M; Chiron, S., “Determination of imidacloprid in vegetables by highperformance liquid chromatography with diode-array detection”, *Journal of Chromatography*, **1996**, 721: 97-105.
- ❖ Gil, M; Martinez, A; Valverde, R; Galanti, A; Girotti, S., “Column switching liquid chromatography and post-column photochemically fluorescence detection to determine imidacloprid and 6-chloronicotinic acid in honeybees” *Journal of Chromatography*, **2007**, 1147: 17-23.
- ❖ Goulson, D., “An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides”, *Journal of Applied Ecology*, **2013**, 50: 977-987.
- ❖ Gupta, R. C., “Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles”, First Ed., California, USA, **2007**, p. 502-507.

- ❖ Hayasaka, D; Korenaga, T; Suzuki, K, Saito, F; Sánchez-Bayo, F; Goka, K., “Cumulative ecological impacts of two successive annual treatments of imidacloprid and fipronil on aquatic communities of paddy mesocosms”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2012**, 80: 355-362.
- ❖ Krieger, R. I., “Handbook of Pesticide Toxicology, Principles”, Second Ed. California, USA, **2001**, p. 1123-1130.
- ❖ Lagalante, A; Greenbacker, P., “Flow injection analysis of imidacloprid in natural waters and agricultural matrixes by photochemical dissociation, chemical reduction, and nitric oxide chemiluminescence detection”, *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 590: 151-158.
- ❖ Llorent-Martinez, E; Fernández de Córdoba, M., “Reagentless photochemically-induced fluorimetric determination of fipronil by sequential-injection analysis”, *Analytical Letters*, **2011**, 44: 2606-2616.
- ❖ López, J; Molina, A; Fernández de Córdoba, M., “Development of a photochemically induced fluorescence-based optosensor for the determination of imidacloprid in peppers and environmental waters”, *Talanta*, **2007**, 72: 991-997.
- ❖ Olivieri, A. C., " On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties", *Journal of Chemometrics*, **2005**, 19: 253–265.
- ❖ Olivieri, A; Escandar, G; Muñoz de la Peña, A., “Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms”, *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, 30: 607-617.
- ❖ Olivieri, A.; Faber, N., "A closed-form expression for computing the sensitivity in second-order bilinear calibration", *Journal of Chemometrics*, **2005**, 19: 583–592.
- ❖ Qiao, F; Zhang, X; Wang, M; Kang, Y., “Rapid Extraction of Imidacloprid in Tomatoes by Ultrasonic Dispersion Liquid–Liquid Microextraction Coupled with LC Determination”, *Chromatographia*, **2010**, 72: 331-335.

- ❖ Rancan, M; Rossi, S; Sabatini, A., “Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor”, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1123: 60-65.
- ❖ Ratnieks, F; Carreck, N., “Clarity on Honey Bee Collapse?”, *Science*, **2010**, 327:152- 153.
- ❖ Reglamento de Ejecución (UE) No 485/2013), <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:ES:PDF>, última visita 26 de febrero 2014.
- ❖ Rodríguez, M; Durán, I; Ornelas, N; López de Alba, P; López, L., “Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391: 1119-1127.
- ❖ SAG, Informe de venta de uso de plaguicidas agrícola en Chile, 2008. <http://www.sag.cl/sites/default/files/informe%20venta%20de%20plaguicidas%202008%20modificado.pdf>, última visita 24 de febrero 2014.
- ❖ Sánchez-Bayo, F; Hyne, R., “Detection and analysis of neonicotinoids in river waters – Development of a passive sampler for three commonly used insecticides”, *Chemosphere*, **2014**, 99: 143-151.
- ❖ Schippers, N; Schwack, W., “Photochemistry of Imidacloprid in Model Systems”, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56: 8023-8029.
- ❖ Starner, K; Goh, K., “Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011”, *Bull Environ Contam Toxicol*, **2012**, 88: 316-321.
- ❖ Subhani, Q; Huang, Z; Zhu, Z; Zhu, Y., “Simultaneous determination of imidacloprid and carbendazimin water samples by ion chromatography with fluorescence detector and post-column photochemical reactor”, *Talanta*, **2013**, 116: 127-132.

- ❖ Tapparo, A; Marton, D; Giorio, C; Zanella, A; Solda, L; Marzaro, M; Vivan, L; Girolami, V., “Assessment of the Environmental Exposure of Honeybees to Particulate Matter Containing Neonicotinoid Insecticides Coming from Corn Coated Seeds”, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46: 2592-2599.
- ❖ The Food & Environment Research Agency, Defra, <https://secure.fera.defra.gov.uk.pusstats>, última visita 26 de febrero 2014.
- ❖ Tisler, T; Jemec, A; Mozetic, B; Trebse, P., “Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment”, *Chemosphere*, **2009**, 76: 907-914.
- ❖ Vilchez, J; El-Kattabi, R; Blanc, R; Navalón, A., “Photochemical Fluorimetric method for the determination of the insecticide imidacloprid in water samples”, *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 371: 247-253.
- ❖ Vilchez, J; El-Khattabi, R, Fernández, J; González-Casado, A; Navalón, A., “Determination of imidacloprid in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, **1996**, 746: 289-294.
- ❖ Vilchez, J; Valencia, M; Navalón, A; Molinero-Morales, B; Capitán-Vallvey, L., “Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection”, *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 439: 299,305.
- ❖ Wamhoff, H; Schneider, V., “Photodegradation of Imidacloprid”, **1999**, 47: 1730-1734.
- ❖ Wu, Qihua; Li, Z; Wang, C; Wu, C; Wang, W; Wang, Z., “Dispersive Solid-Phase Extraction Clean-up Combined with Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Neonicotinoid Insecticides in Vegetable Samples by High-Performance Liquid Chromatography”, *Food Anal. Methods*, **2011**, 4: 559-566.
- ❖ Zabar, R; Komel, T; Fabjan, J; Bavcon, M; Trbse, P., “Photocatalytic degradation with immobilised TiO₂ of three selected neonicotinoid insecticides: Imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin”, *Chemosphere*, **2012**, 89: 293-301.

- ❖ Zhang, S; Yang, X; Yin, X; Wang, C; Wang, Z., "Dispersive liquid–liquid microextraction combined with sweeping micellar electrokinetic chromatography for the determination of some neonicotinoid insecticides in cucumber samples", *Food Chemistry*, **2012**, 133: 544-550.
- ❖ Zeep, R.; Sheldon, W.; Moran, M., "Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation–emission matrices", *Marine Chemistry*, **2004**, 89: 15-36.

ANEXO.

Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación para cada set de validación.

Con el objetivo de esclarecer las concentraciones obtenidas en cada set de validación se presentan una serie de tablas con el detalle de la concentración predicha para cada muestra, además del porcentaje de recuperación y los límites de detección.

Tabla A. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación en solvente con interferentes determinado mediante U-PLS/RBL.

Muestra	U-PLS/RBL			
	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
V1	0,72	0,74	103	0,021
V2	0,22	0,22	98	0,033
V3	0,44	0,36	83	0,013
V4	0,38	0,39	103	0,014
V5	0,64	0,71	111	0,028
V6	0,50	0,50	100	0,013
V7	0,29	0,31	105	0,026
V8	0,68	0,68	100	0,019
V9	0,20	0,24	120	0,029
V10	0,58	0,61	106	0,036

Tabla B. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación en solvente con interferentes determinado mediante PARAFAC.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	PARAFAC		
		Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
V1	0,72	0,64	89	0,003
V2	0,22	0,18	82	0,003
V3	0,44	0,35	80	0,002
V4	0,38	0,39	103	0,003
V5	0,64	0,61	95	0,003
V6	0,50	0,46	92	0,002
V7	0,29	0,33	114	0,009
V8	0,68	0,64	94	0,002
V9	0,20	0,22	110	0,004
V10	0,58	0,54	92	0,003

Tabla C. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción DLLME con interferentes determinado mediante HPLC.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	HPLC	
		Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)
V1	0,72	0,43	60
V2	0,22	0,16	71
V3	0,44	0,26	59
V4	0,38	0,19	50
V5	0,64	0,42	66
V6	0,50	0,25	51
V7	0,29	0,21	71
V8	0,68	0,43	64
V9	0,20	0,11	58
V10	0,58	0,38	65

Tabla D. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción DLLME con interferentes determinado mediante U-PLS/RBL con 1 RBL (Respecto del valor nominal y HPLC).

Muestra	U-PLS/RBL			
	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD (ng ml^{-1})
V1	0,72	0,44	61 / 102	0,33
V2	0,22	0,13	59 / 81	0,30
V3	0,44	0,26	59 / 100	0,28
V4	0,38	0,26	67 / 137	0,32
V5	0,64	0,34	53 / 81	0,56
V6	0,50	0,28	56 / 112	1,04
V7	0,29	0,19	64 / 90	0,35
V8	0,68	0,40	59 / 93	1,08
V9	0,20	0,14	72 / 127	0,29
V10	0,58	0,38	66 / 100	0,37

*La muestra V5 no fue considerada por mala predicción con respecto al valor nominal.

Tabla E. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción DLLME con interferentes determinado mediante U-PLS/RBL con 2 RBL (Respecto del valor nominal y HPLC).

Muestra	U-PLS/RBL			
	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD (ng ml^{-1})
V1	0,72	0,51	71 / 119	0,59
V2	0,22	0,17	76 / 106	0,40
V3	0,44	0,35	79 / 135	0,47
V4	0,38	0,31	80 / 163	0,43
V5	0,64	0,36	56 / 86	0,75
V6	0,50	0,31	63 / 124	0,75
V7	0,29	0,21	72 / 100	0,84
V8	0,68	0,49	72 / 114	0,80
V9	0,20	0,18	88 / 164	0,55
V10	0,58	0,49	84 / 129	0,89

*La muestra V5 no fue considerada por mala predicción con respecto al valor nominal.

Tabla F. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción DLLME con interferentes determinado mediante PARAFAC (Respecto del valor nominal y HPLC).

Muestra	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	PARAFAC		
		Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD (ng ml^{-1})
V1	0,72	0,43	59 / 100	0,58
V2	0,22	0,11	52 / 69	0,58
V3	0,44	0,27	61 / 104	0,56
V4	0,38	0,27	72 / 142	0,58
V5	0,64	0,42	66 / 100	0,46
V6	0,50	0,00	0 / 0	0,86
V7	0,29	0,10	35 / 48	0,68
V8	0,68	0,02	3 / 5	0,82
V9	0,20	0,11	54 / 100	0,58
V10	0,58	0,35	60 / 92	0,58

*La muestra V6 y V8 no fueron consideradas por mala predicción con respecto al valor nominal.

Tabla G. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción SPE C-18 con interferentes determinado mediante U-PLS/RBL.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	U-PLS/RBL		
		Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD (ng ml^{-1})
V1	0,72	0,84	117	1,08
V2	0,22	0,24	107	0,48
V3	0,44	0,57	130	1,17
V4	0,38	0,34	88	1,27
V5	0,64	0,81	126	1,61
V6	0,50	0,35	70	1,02
V7	0,29	0,30	103	1,98
V8	0,68	0,56	82	1,78
V9	0,20	0,22	112	0,36
V10	0,58	0,32	54	1,72

*La muestra V10 no fue considerada por mala predicción con respecto al valor nominal.

Tabla H. Detalle de concentraciones y porcentaje de recuperación del set de validación con extracción SPE C-18 con interferentes determinado mediante PARAFAC.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	PARAFAC		
		Concentración Predicha ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	LOD (ng ml^{-1})
V1	0,72	0,83	115	0,54
V2	0,22	0,29	132	0,52
V3	0,44	0,61	139	0,50
V4	0,38	0,40	105	0,54
V5	0,64	0,84	131	0,54
V6	0,50	0,45	90	0,54
V7	0,29	0,36	124	0,54
V8	0,68	0,56	82	0,56
V9	0,20	0,26	130	0,56
V10	0,58	0,36	62	0,54

*Las muestras V3 y V10 no fueron consideradas por mala predicción con respecto al valor nominal.